



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

*Efecto de flavonoides (extractos de fresno,
spergularia y granada) sobre ratones diabéticos
db/db*

D^a. VIOLETA VILAPLANA VIVO

2013



**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN
EN ENVEJECIMIENTO**

*Efecto de flavonoides (extractos de fresno,
spergularia y granada) sobre ratones diabéticos
db/db*

D^a. VIOLETA VILAPLANA VIVO

2013

a mi abuela

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis no habría sido posible sin la ayuda y los ánimos de mucha gente que ha estado ahí aportando su granito de arena.

En primer lugar me gustaría darle las gracias al Dr. Vicente Vicente Ortega, por brindarme la oportunidad de participar de este proyecto, ser uno de mis directores de tesis y tratarme siempre con tanto cariño.

Al Dr. Francisco J. Gómez García, mi director de tesis, al que agradezco su ayuda, sus conocimientos y su apoyo. Muchas gracias por sacar tiempo para dedicármelo y haber tenido tanta paciencia conmigo.

A la Dra. Nuria García Carrillo, mi directora de tesis, nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mi. Solo puedo decirte un millón de gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio: Víctor, Alberto, Ester, Laura y Rocío, por su ayuda en la elaboración de la parte experimental.

A mis compañeras de batalla, Olga y M^a José, por estar ahí siempre y darme ánimos cuando los necesitaba. Sabéis que me tenéis para lo que queráis, espero que el tiempo nos lleve por el mismo camino y sigamos manteniendo el contacto.

A todos los compañeros del animalario, por haberme hecho más fácil el trabajo.

A la empresa Naturex S.L., por proporcionarnos los compuestos fenólicos utilizados en este trabajo y por colaborar con sus conocimientos en el campo de los polifenoles.

A la Dr. Fara Saez, por sus conocimientos y colaboración en este trabajo.

Al Dr. Manuel Canteras, por su valiosa colaboración en el análisis estadístico e interpretación de los datos obtenidos en este estudio.

Al Dr. José Joaquín Cerón, del laboratorio de Análisis Clínicos de veterinaria, por su contribución en esta tesis.

A mis padres, por estar siempre ahí y apoyarme en todo. Sin vuestro esfuerzo no habría llegado hasta aquí.

A mis hermanos, por ayudarme siempre que lo necesito y estar a mi lado en todo momento.

Y por último, a mi ángel de la guarda, que no podía faltar aquí. Has estado a mi lado dándome todo tu apoyo y aguantando los malos momentos, que han sido muchos. Muchas gracias Juanfran por tu paciencia, cuidarme y estar siempre a mi lado.

ÍNDICE

I. Introducción	13
II. Antecedentes	19
Páncreas	21
Control de la homeostasis de la glucosa	29
Diabetes Mellitus	42
Modelos animales de experimentación	77
Polifenoles	86
Flavonoides	89
III. Objetivos	109
IV. Material y Métodos	113
1. Materiales	115
Animales de experimentación	115
Aparatos	117
Agentes	118

2. Métodos	122
Determinación de parámetros plasmáticos	124
Determinación de parámetros relacionados con la glucemia	126
Determinación de parámetros bioquímicos generales	129
Deterioro cognitivo relacionado con la diabetes: biomarcadores y test de conducta	131
Estudio histopatológico del páncreas	136
V. Resultados	141
Variaciones morfológicas	143
Parámetros bioquímicos relacionados con la glucemia	147
Parámetros bioquímicos generales	155
Deterioro gognitivo relacionado con la diabetes	175
Estudio histopatológico	184
VI. Discusión	189
VII. Resumen	209
VIII. Conclusiones	213
IX. Bibliografía	217

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente, la Asociación americana de Diabetes (AAD, 2013) ha definido la *Diabetes Mellitus* (DM) como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultante de la alteración de la secreción de insulina, la acción de la insulina, o ambas. La hiperglucemia crónica de la DM se asocia con el daño a largo plazo, la disfunción y el fallo orgánico, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la DM, desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina hasta las anomalías que provocan resistencia a la acción de la insulina. La base de las anomalías del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas en la DM es la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos diana. La deficiente acción de la insulina proviene de su secreción inadecuada y/o la disminución de la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o más puntos de la compleja vía de la acción hormonal. El deterioro de la secreción de insulina y los defectos de la acción insulínica suelen coexistir en el mismo paciente, y no está establecido cuál de las anomalías es la causa principal de la hiperglucemia, si es que actúan por sí solas.

La prevalencia mundial de la diabetes ha aumentado impresionantemente en los últimos años. Según la Organización Mundial de la Salud en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes (OMS, 2013).

La prevalencia de ambos tipos de diabetes, es decir, tipo 1 y tipo 2, aumenta a nivel mundial, pero la de tipo 2 lo hace de una manera mucho más rápido debido al aumento de la obesidad en la población y la disminución de la actividad física conforme se industrializa cada vez un mayor número de países. Es semejante en varones y mujeres en todos los límites de edad, pero levemente mayor en varones de 60 años o más.

Las estimaciones a nivel mundial indican que en el año 2030 el número mayor de diabéticos tendrá 45 a 64 años de vida (OMS, 2013).

El modelo espontáneo de ratón db/db es un buen modelo de experimentación debido a que a partir de las cuatro semanas de vida los animales presentan hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperfagia y obesidad por lo que representan un buen modelo para estudiar la diabetes. El “gen de la diabetes” (db) se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria (Chen, 1996). La mutación db/db muestra muchas de las características de la DM2 humana (Sharma, 2003).

Los ratones db/db son insensibles al suministro de leptina exógena (Campfield, 1996). La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días, acusando ya discreta elevación de la glucemia alrededor del mes y siendo franca la hiperglicemia a las 8 semanas de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células β de los islotes, entrando en la fase hipoinsulinémica (Like, 1972; Bodary, 2002; Bodary, 2005; Surmi, 2008).

Existen numerosos estudios que demuestran los beneficios aportados por las dietas ricas en vegetales. Distintos autores han demostrado que la ingesta abundante de frutas y verduras reduce el riesgo de padecer desde enfermedades inflamatorias (Kim, 2004a; Kim, 2004b; Rahman, 2006) a varios tipos de cáncer (cáncer gástrico y de esófago (Sun, 2002), de próstata (Berkow, 2007; Gates, 2009; Wang, 2009), etc.). Aunque hay numerosas moléculas implicadas en estos efectos saludables, probablemente el grupo más importante sea el de los flavonoides (Chun, 2005).

Estos compuestos polifenólicos, de los cuales hay descritos más de 8000 (Benavente-García, 2008), son metabolitos secundarios de las plantas, con numerosas funciones dentro del reino vegetal, desde protección frente a la radiación, a predadores o patógenos (Havsteen, 2002; Del Río, 2004; Ortuño, 2006; Stevenson, 2007), hasta el establecimiento de simbiosis con bacterias, insectos o animales (Havsteen, 2002).

Una vez incorporados a la dieta humana, los polifenoles pueden tener variados efectos. Como antioxidantes, se les ha atribuido una gran cantidad de propiedades beneficiosas para la salud, ya que pueden proteger estructuras celulares del ataque de especies reactivas del oxígeno y así limitar el riesgo de padecer enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Existen numerosos estudios que atribuyen a los polifenoles de la dieta un importante papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y *Diabetes Mellitus* (Scalbert, 2005).

Muchas plantas han sido tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de la diabetes. Los polifenoles contenidos en estas plantas puede explicar parte de su actividad terapéutica (Marles, 1995; Gray, 1997). Los polifenoles pueden afectar la glucemia a través de diferentes mecanismos, incluyendo la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o de su absorción por los tejidos periféricos (Welsch, 1989; Matsumoto, 1993; Gee, 2000; Matsui, 2002).

Los polifenoles no sólo podrían inhibir la absorción de glucosa en el intestino delgado, sino que también podrían limitar su reabsorción en el riñón, como se ha demostrado con la florizina (Dimitrakoudis, 1992).

II. ANTECEDENTES

PÁNCREAS

El páncreas es una glándula digestiva elongada, de consistencia blanda y de color gris rojizo. En el hombre adulto mide de 20 a 25 cm de largo y su peso varía entre 65 y 160 g. Por sus caracteres exteriores, así como su estructura, presenta gran analogía con las glándulas salivales; de aquí el nombre de glándula salival abdominal con el cual se había designado durante años, *Siebold* (Spalteholz, 1963; Fawcett, 1993; Moore, 1993). Se halla situado en la porción superior del abdomen, por delante de la columna vertebral lumbar, por detrás del estómago, entre el bazo, que corresponde a su extremidad izquierda, y el asa duodenal, que engloba en su concavidad toda su extremidad derecha (Moore, 1993).

Conformación externa:

En el páncreas podemos distinguir tres partes: una parte media o cuerpo; una extremidad derecha o cabeza; y una extremidad izquierda o cola. Entre el cuerpo y la cabeza existe una línea de demarcación, que se conoce con el nombre de cuello o istmo.

1) La cabeza: se halla enclavada en el espacio que limitan en su conjunto las tres primeras porciones y aun a veces las cuatro porciones del duodeno. Su extremidad ínferoexterna se dirige hacia la línea media, formando una eminencia aplanada, casi siempre arrollada en espiral, designado con el nombre de *pequeño páncreas* o *páncreas de Winslow*. La cabeza descansa en el plano posterior en la vena cava inferior, vasos renales derechos y vena renal izquierda. El conducto biliar se apoya, en su camino al duodeno, en un surco de la cara posterosuperior de la cabeza del páncreas y, a veces, está incluido dentro de ella.

2) Istmo o cuello: es la porción estrecha del páncreas que une la cabeza con el cuerpo. Es una porción sumamente aplanada. En el borde superior esta limitado por el duodeno, el páncreas forma una hendidura que abraza el duodeno, por la cual es designado con el nombre de *escotadura superior o duodenal (muesca duodenal de Wiant)*. En su porción interna el borde superior se eleva a veces formando una eminencia más o menos notable, que traspasa la pequeña curvatura del estómago, es el *tuber omentale (tuberosidad epiploida de His)*, llamado así por hallarse cubierto por delante por el epiplón menor. En el borde inferior se encuentra limitado por la *escotadura inferior o escotadura mesentérica* del páncreas, por la cual pasan los vasos mesentéricos superiores.

3) El cuerpo: se halla situado algo más alto que la cabeza del páncreas, cruza la aorta y las vértebras lumbares superiores, por detrás de la bolsa omental. El cuerpo tiene una forma ligeramente triangular, en una sección transversal, y posee tres caras: anterior, posterior e inferior. La cara anterior está cubierta por peritoneo y forma parte del lecho del estómago; en ella se inserta el mesocolon transversal. La cara posterior carece de recubrimiento peritoneal y se halla en contacto con la aorta, arteria mesentérica superior, glándula suprarrenal izquierda y riñón izquierdo con los vasos correspondientes. El cuerpo del páncreas está íntimamente relacionado con la vena esplénica. Por delante de la aorta, el cuerpo del páncreas está situado entre el tronco celíaco y la arteria mesentérica superior. El borde inferior del cuerpo del páncreas separa la cara posterior de la cara inferior. Posee una pequeña proyección o tuberosidad omental que se origina en el borde superior y entra en contacto con el omento menor. Esta tuberosidad se encuentra inmediatamente inferior al tronco celíaco.

4) La cola: unas veces se presenta aplanada, delgada y como afilada, y otras, al contrario, redondeada y roma o bien ligeramente hinchada en forma de maza. Sus relaciones son también muy variables: a veces está en contacto inmediato

con el bazo, y otras se halla separada de dicho órgano por un intervalo que varía ordinariamente de 1 a 4 centímetros, en este caso los dos órganos se encuentran unidos por un repliegue del peritoneo, conocido con el nombre de *epiplón pancreático-esplénico*. Pasa entre las dos túnicas del ligamento hepatorenal con los vasos esplénicos y en general termina en contacto con el hilio esplénico (Fawcett, 1993; Moore, 1993).

A veces podemos encontrarnos variaciones:

- Páncreas anular: rodea por completo la porción descendente del duodeno, a la altura de la ampolla hepatopancreática.
- Páncreas dividido: conserva su disposición embrionaria, en el que cada porción posee un conducto excretor propio.
- Islotes pancreáticos aberrantes: situados en los mesos de la vecindad (Latarjet, 2005).

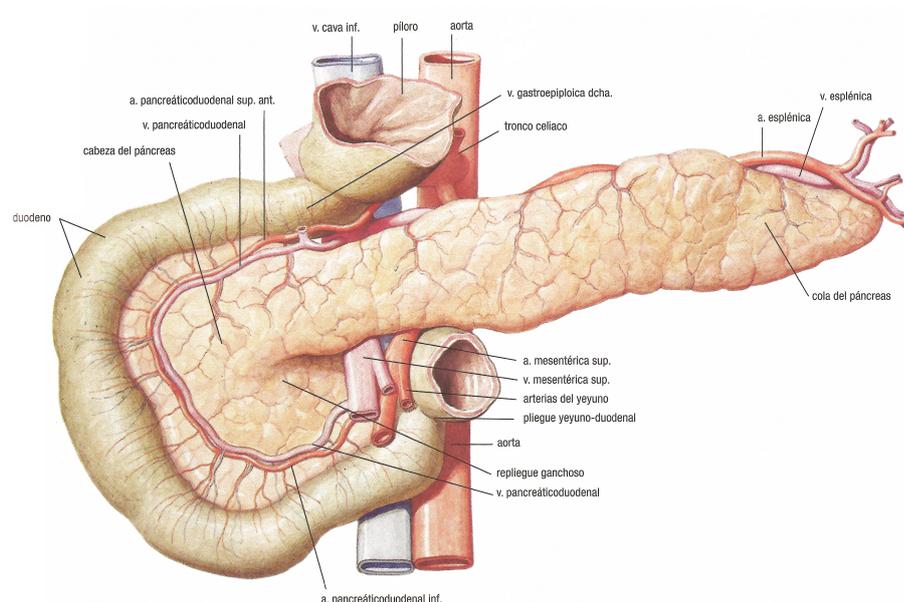


Figura 1. Vista frontal de Páncreas. La imagen ha sido obtenida del Atlas ilustrado de Anatomía.

Inervado por fibras que derivan del plexo celiaco, el páncreas tiene una estructura distinta según la función desarrollada por cada una de sus partes (Fawcett, 1993; Moore, 1993; Latarjet, 2005).

Estructura histológica:

El páncreas es, como el hígado, un órgano complejo que contiene, íntimamente mezcladas una con otra, dos glándulas morfológicamente diferentes: una glándula de secreción externa, en la cual el jugo pancreático es vertido en el duodeno por los conductos pancreático y pancreático accesorio; y una glándula de secreción interna (la insulina, el glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático) que se vierte en la sangre. Estas hormonas tienen una acción esencial de la regulación del metabolismo (Latarjet, 2005).

a) Páncreas exocrino (secreción externa):

El páncreas exocrino pertenece morfológicamente a la clase de las glándulas en racimo, se divide en lóbulos primitivos, los cuales a su vez se descomponen en lóbulos secundarios y éstos a su vez en acinos.

- Acinos pancreáticos: Los acinos o sáculos secretorios son los elementos fundamentales del páncreas, son morfológicamente equivalentes, conociendo solamente uno de ellos podemos tener noción completa de todo el órgano: cada uno de ellos es un páncreas minúsculo. Los acinos están compuestos por una pared propia, un epitelio y una cavidad central.
- Aparato excretor: Al salir de los acinos pancreáticos, los conductillos excretores o conductos intercalares, se conducen exactamente como en las glándulas salivales. Dichos conductillos terminan en conductos cada vez más voluminosos, que constituyen sucesivamente los conductos intralobulillares y los conductos interlobulillares, los cuales, a su vez, desembocan,

finalmente, en dos conductos principales:

- El conducto principal o de Wirsung, que atraviesa el páncreas longitudinalmente y desemboca en la papila mayor del duodeno (*papila de Vater*), junto al colédoco, con el que se une distalmente.
- El conducto accesorio o canal de Santorini, que desemboca en la papila menor del duodeno (Fawcett, 1993; Moore, 1993; Latarjet, 2005).

a) Páncreas endocrino (secreción interna):

El páncreas endocrino esta representado por un sistema de corpúsculos redondeados u ovals, de coloración relativamente clara, diseminados sin orden entre los acinos de la glándula exocrina, son los islotes de Langerhans, que fueron descubiertos en 1869 por el histólogo Paul Langerhans. 20 años más tarde, Von Mering y Minkowski (1889) fueron los encargados de esclarecer la función endocrina del páncreas; pero fue Laguesse, en 1894, el que atribuyó esta función a los islotes pancreáticos, a los cuales nombró islotes de Langerhans.

En el ser humano, los términos cabeza, cuello, cuerpo y cola se utilizan para designar las regiones del órgano de proximal a distal, mientras que en roedores la forma del páncreas esta bastante menos definida (Slack, 1995). El conducto pancreático principal entra en la papila duodenal pero comúnmente en el ratón más de un conducto entra en el duodeno. La renovación de las células es de aproximadamente 0,6%/día en los conductos pancreáticos pequeños y 1% en los conductos grandes, un recambio celular que es de una orden de magnitud mayor que las células de los islotes (0,14%) o células acinares (0,02-0,07%) (Maronpot, 1999).

El páncreas del ratón se desarrolla por fusión de los rudimentos pancreáticos dorsales y ventrales derivados del intestino anterior. En el ratón el primordio pancreático aparece en el día 11 de la gestación. El conducto pancreático contiene un precursor indiferenciado de células que migran a través del conducto para formar tanto los

islotes como las células acinares (Maronpot, 1999).

El páncreas del ratón, al igual que el de humano, posee dos glándulas, una de secreción externa (páncreas exocrino) y otra de secreción interna (páncreas endocrino) (Maronpot, 1999).

Islotes de Langerhans:

Histológicamente, los islotes de Langerhans están formados por nidos celulares, de calibre muy irregular, contorneados sobre sí mismos, más o menos anastomosados, separados unos de otros por tejido conjuntivo y vasos. Las células de los islotes, son generalmente claras, aunque, entre ellas se encuentran otras más o menos oscuras. Es muy probable que unas y otras representen el mismo elemento en dos estadios funcionales diferentes: las células oscuras (estadio de actividad), que han elaborado y continúan elaborando productos de secreción, y las células claras (estadio de reposo), que se han liberado de esos productos en el vaso vecino.

Los islotes pancreáticos son de gran importancia, ya que representan el centro de control de la homeostasia de la glucosa en el organismo. Para lograrlo, deben estar ricamente vascularizados e inervados, de tal manera que puedan responder a los estímulos metabólicos, endocrinos o nerviosos que continuamente se producen en el organismo.

El páncreas de un humano adulto normal está compuesto por cerca de un millón de islotes, los cuales constituyen el 2-3% del total de la masa de la glándula. Los islotes poseen un tamaño ampliamente variable, desde unas pocas docenas de células hasta miles de ellas. Los islotes, en el adulto pesan sólo de 1 a 1,5 g y mayoritariamente suelen medir entre 100 y 200 μm y están formados por cuatro tipos principales de células: β , α , δ y PP (polipéptido pancreático); y otros dos tipos secundarios.

- Células β : son las encargadas de producir insulina.
- Células α : son las encargadas de secretar glucagón, sustancia

que induce hiperglucemia debido a su actividad glucogenolítica en el hígado.

- Células δ : contienen somatostatina, sustancia que suprime la liberación de insulina y glucagón.
- Células PP: contienen un único polipéptido pancreático que provoca diversos efectos gastrointestinales, tales como la estimulación de la secreción de enzimas gástricas e intestinales y la inhibición de la motilidad intestinal.

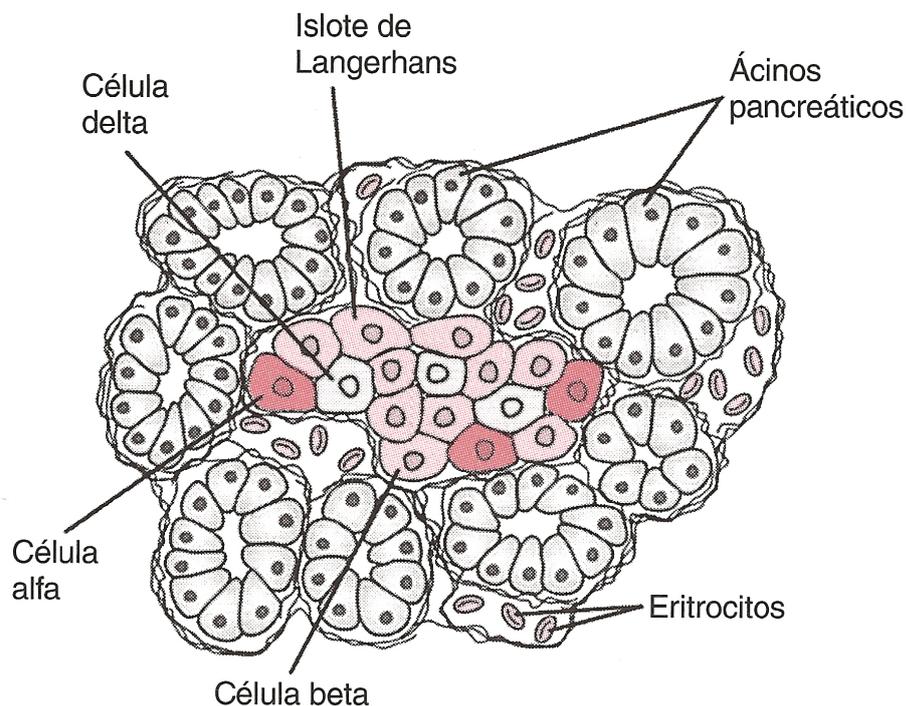


Figura 2. Anatomía fisiológica de un islote pancreático de Langerhans. La imagen ha sido obtenida del libro Tratado de Fisiología Médica.

Las células α están localizadas en la periferia del islote, en la zona central del islote se encuentran las células β , que son las células mayoritarias, y entre ambas se encuentran las células δ y las PP. La proporción de células α , β , δ y PP en un islote adulto es de 20:68:10:2 respectivamente. Las hormonas que son producidas en los islotes pancreáticos son directamente liberadas a los capilares sanguíneos y a través de la vena porta son transportadas hasta el hígado y al resto del organismo.

La proporción de células β en los islotes varía de especie a especie. En los islotes de ratones normales hay aproximadamente un 80% de células β .

En el caso de los islotes de ratón la distribución celular es distinta y las células β forman grupos celulares que se intercalan entre células no- β (Bonner-Weir, 1988).

En los roedores hay bastante fuerte segregación dentro de los islotes de modo que las células β se encuentran en el centro y los otros tipos en la periferia, mientras que en el ser humano esta segregación, aunque presente, es menos clara (Slack, 1995).

Las funciones del páncreas son digestivas y hormonales:

- Las enzimas secretadas por el tejido exocrino del páncreas ayudan a la degradación de carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos en el duodeno. Estas enzimas son transportadas por el conducto pancreático hacia el conducto biliar en forma inactiva. Cuando entran en el duodeno, se vuelven activas. El tejido exocrino también secreta un bicarbonato para neutralizar el ácido del estómago en el duodeno.
- Las hormonas secretadas en el páncreas por el tejido endocrino son la insulina y el glucagón (que regulan el nivel de glucosa en la sangre) y la somatostatina (que previene la liberación de las otras dos hormonas).

CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA

La glucosa es la principal fuente de energía que utiliza la célula para poder llevar a cabo el metabolismo normal, de modo que se convierte en el principal combustible utilizado por la célula para producir energía (ATP) (Pocock, 2002).

En el hombre, la regulación de la concentración del azúcar en sangre es esencial para el organismo, ya que estados de hipoglucemia o hiperglucemia extremos pueden ser críticos para la supervivencia. La regulación de la concentración de glucosa se efectúa por medio de un equilibrio entre el flujo de glucosa dentro y fuera del espacio extracelular a través de la secreción regularizada de insulina y glucagón (Unger, 1991; DeFronzo, 1997).

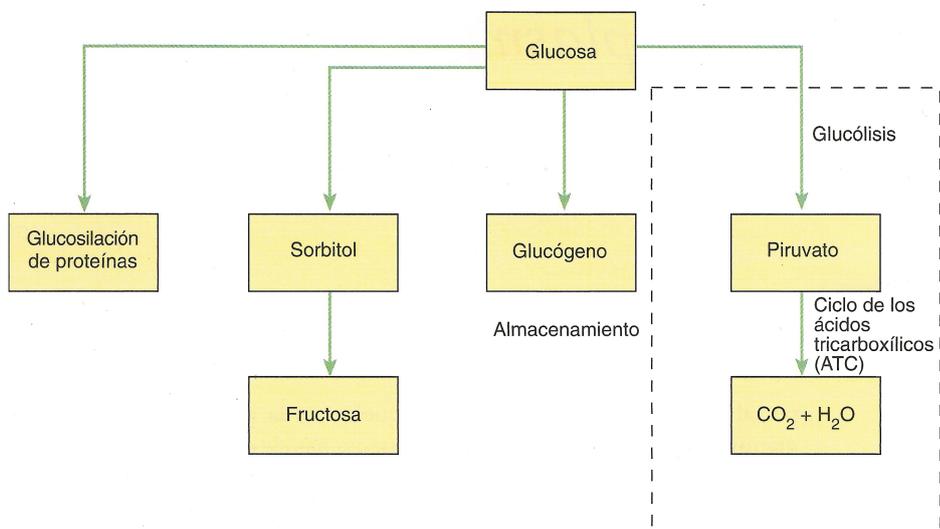


Figura 3. Principales vías relacionadas con el metabolismo de la glucosa. La imagen ha sido obtenida del libro Fisiología Humana. La base de la Medicina.

Posteriormente a la ingestión de alimentos, el mantenimiento de la homeostasia de la glucosa depende de tres procesos que suceden paralelamente de forma sistematizada:

- 1) En respuesta al incremento de la glucosa plasmática, se estimula la producción y secreción de insulina por parte de las células β del páncreas.
- 2) El incremento en la glucemia y en la insulinemia induce la captación de glucosa por los tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo).
- 3) Se inhibe la secreción de glucagón, por lo que suprime la producción hepática de glucosa.

Durante el ayuno, la captación de glucosa se produce en tejidos insulino independientes, especialmente en el cerebro. La normogluemia se mantiene gracias a la acción del glucagón y de otros factores hormonales y nerviosos, a través de un incremento en la producción de glucosa por parte del hígado (mediante la estimulación de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis) (DeFronzo, 1997).

La glucosa, para poder ser utilizada, ha de ser transportada al interior de las células y, posteriormente, debe ser fosforilada a glucosa-6-fosfato (glucosa-6-P). El transporte es realizado por un sistema de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs), situadas en la membrana plasmática. Posteriormente, un grupo de proteínas citoplasmáticas, denominadas hexoquinas se encargan de la fosforilación. La glucosa-6-P resultante podrá intervenir en las diferentes vías metabólicas, como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato o ser almacenada en forma de glucógeno.

- Efecto antipirólítico.
- Estimulación de la síntesis de DNA y de proteínas.

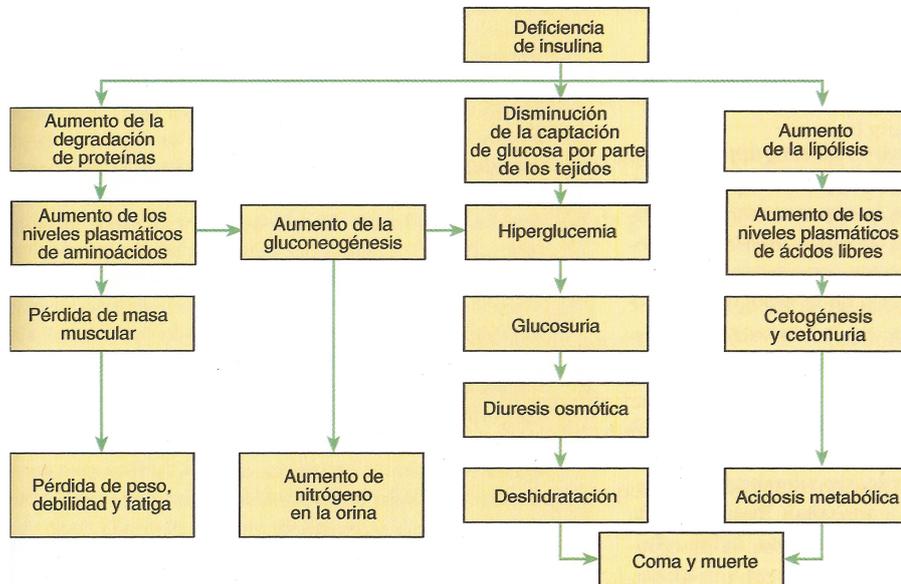


Figura 5. Consecuencias agudas y crónicas de la deficiencia de insulina. La imagen ha sido obtenida del libro Fisiología Humana. La base de la Medicina.

Biosíntesis de insulina:

La síntesis de insulina es un proceso complejo que implica la formación de dos moléculas precursoras, la preproinsulina y la proinsulina. En humanos, el gen que codifica la preproinsulina, el precursor primario de la insulina, está localizado en el brazo corto del cromosoma 11. Posee tres exones: el primero codifica el péptido señal y el extremo N-terminal de la preproinsulina, el segundo la cadena B y parte del péptido C, y el tercero el resto del péptido C y la cadena A.

La insulina es sintetizada por ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso. Los 25 primeros aminoácidos de la preproinsulina constituyen el péptido señal que permite la entrada de la proteína dentro del retículo endoplasmático, asegurando la

descarga de la preproinsulina al espacio cisternal. A continuación, se produce una separación proteolítica del péptido señal, con lo que la preproinsulina se transforma en proinsulina, que rápidamente se pliega y se forman los puentes disulfuro. La proinsulina está compuesta por una única cadena polipeptídica de 86 aminoácidos. Contiene las cadenas A y B de la insulina con la misma conformación que la insulina, pero se encuentran unidas por un péptido de conexión de 35 aminoácidos, llamado péptido C, que une el extremo carboxiterminal de la cadena B con el extremo aminoterminal de la cadena A. La proinsulina tiene solo un 5% de la actividad biológica de la insulina (Pickup, 1997).

Una vez plegada, la proinsulina se transporta al aparato de Golgi donde es empaquetada en vesículas. La conversión de proinsulina a insulina implica la acción secuencial de proteasas específicas, la PC1 (también conocida como PC3) y la PC2, que están presentes en los gránulos de almacenaje. Estas endopeptidasas tienen como función romper la molécula por lugares específicos: la PC1 es responsable de la rotura entre Agr31 y Agr32 (Baillyes, 1992) y la PC2 es la encargada de la rotura entre Lys64 y Agr65 (Bennett, 1992), induciendo la separación del péptido de conexión. Al liberarse del péptido C, la insulina, dado que se transforma en una molécula menos soluble, forma cristales en presencia de Zn^{2+} , lo que permite el almacenamiento de la hormona de forma más concentrada (Landstrom, 1988).

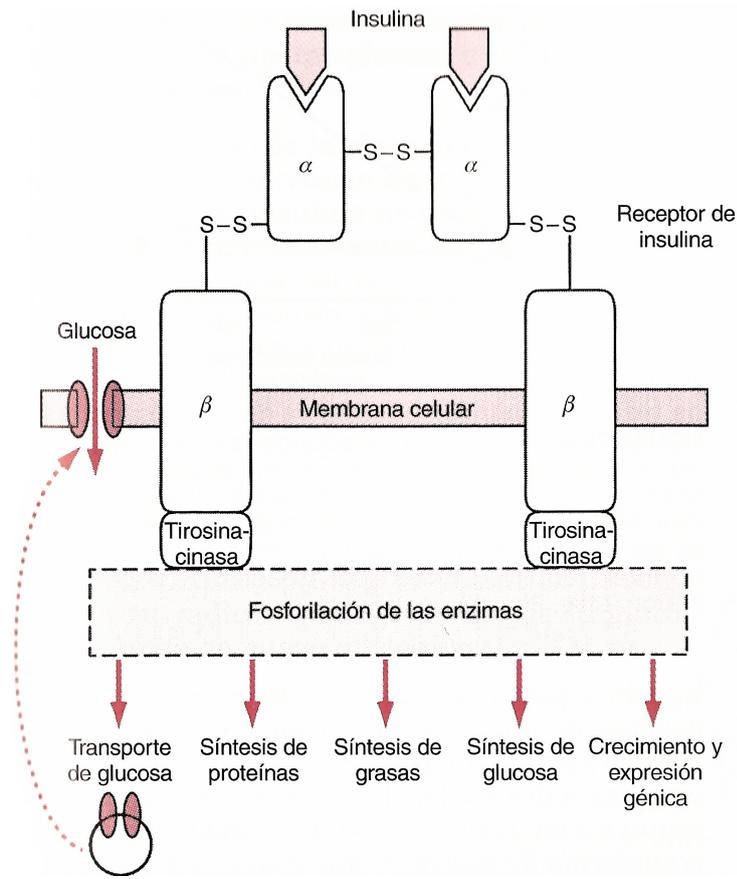


Figura 6. Esquema de un receptor de insulina. La imagen ha sido obtenida del libro Tratado de Fisiología Médica.

Regulación de la biosíntesis de la insulina:

Para la regulación de la homeostasia energética y el control de la glucemia es fundamental la secreción de insulina por las células β de los islotes pancreáticos. Para evitar la hiperglucemia es necesario un aumento en la secreción de insulina, mientras que en el caso de la hipoglucemia es necesaria la liberación de glucagón y adrenalina. Cuando se producen alteraciones en la función de las células β del páncreas se originan graves problemas metabólicos como la DM.

La biosíntesis de la insulina en las células β está regulada, primordialmente, por la concentración extracelular de glucosa, que

básicamente actúa a través de tres mecanismos:

- 1) Un incremento selectivo de la transcripción del gen de la insulina.
- 2) Una estabilización de los mRNA de insulina preformados.
- 3) Una rápida y selectiva estimulación de la traducción de los mRNA de insulina.

Se conocen una gran variedad de factores reguladores de la biosíntesis y secreción de insulina. Entre ellos podemos encontrar nutrientes como la glucosa, aminoácidos, cuerpos cetónicos y ácidos grasos; algunos mediadores del sistema nervioso como la noradrenalina, galanina, acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), neuropéptido Y; los eucposanoides (PGE₂); señales hormonales como el glucagón, péptido inhibitorio gástrico (GIP), GLP-1, colecistoquinina; y en último lugar algunos agentes farmacológicos (sulfonilureas). Sin embargo, es importante destacar que la glucosa es el principal factor regulador tanto de la síntesis como de la secreción de la insulina (Pickup, 1997).

Secreción de insulina:

Una vez que la insulina ha sido sintetizada y almacenada en vesículas, se secreta en respuesta a diferentes factores, siendo el más importante la glucosa. Para que la glucosa sea capaz de estimular la secreción de insulina en las células β debe ser convertida en glucosa 6-fosfato y metabolizada a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs.

Los niveles de insulina sérica están controlados en todo momento por las variaciones de las concentraciones extracelulares de nutrientes, hormonas y neurotransmisores. La respuesta insulinosecretora de la célula β a todos los reguladores fisiológicos es rápida, produciéndose segundos después de la exposición a los estímulos. Por otra parte, cambios en la situación fisiológica del

animal (modificaciones debidas a factores ontogénicos, nutricionales o endocrinos) conducen a regulaciones adaptativas más lentas de la célula β .

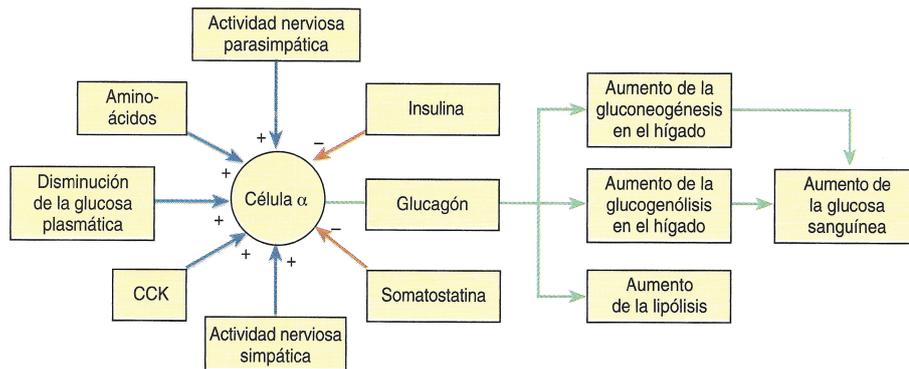


Figura 7. Principales factores relacionados con la secreción de insulina por las células beta de los islotes pancreáticos y efectos principales de esta hormona. La imagen ha sido obtenida del libro Fisiología Humana. La base de la Medicina.

En rata y ratón se encuentran dos insulinas diferentes, insulina I e insulina II, de genes no alélicos y ambos animales presentan diferencia en la proporción relativa. En rata la razón es 2:1 y en ratón 1:2. En rata la razón es mayor en la insulina recién sintetizada que en la insulina almacenada, lo que indica una cinética de conversión más lenta de la proinsulina I (Linde, 1989). Respecto a la proporción proinsulina/insulina, Leahy (Leahy, 1993) la determinó en extractos de páncreas de rata mediante HPLC, encontrando un valor de aproximadamente 11,5%.

Adiponectina:

La adiponectina fue clonada y descrita durante los años 1995 y 1996 por cuatro grupos independientes utilizando técnicas diferentes, por ello, es conocida con distintos nombres según su origen sea humano, *apM1* (Maeda, 1996) y GPB28 (Nakano, 1996), o de ratón, Acrp30 (Sherer, 1995) y adipoQ (Hu, 1996). El *locus* del gen de la adiponectina humana (*apM1*) se localiza en el cromosoma 3q27. La *apM1* consta de 2 intrones y 3 exones que codifican para una proteína de 244 aminoácidos (247 aminoácidos en ratón) que consiste en 4 dominios: un péptido señal de 20 aminoácidos, una región N-terminal variable sin homología conocida, una región colágena y un dominio globular C terminal (Beltowski, 2003; Chandran, 2003).

La adiponectina es una hormona proteica producida casi exclusivamente por los adipocitos que tiene claros efectos antidiabéticos y antiaterogénicos en humanos y roedores, y un posible papel en el control hipotalámico de la homeostasis energética (Kadowaki, 2006; Kadowaki, 2008). La adiponectina circula en plasma en forma de oligómeros de diferente peso molecular (trímeros, hexámeros, y multímeros de 12 a 18 monómeros) y funciona vía interacción con dos tipos de receptores de membrana, AdipoR1 (expresado en numerosos tejidos) y AdipoR2 (expresado en el hígado, fundamentalmente), y manifiesta una mayor afinidad por la forma de estructura completa (Kadowaki, 2005). También se ha demostrado la expresión de ambos receptores en células β pancreáticas, con valores de expresión parecidos o superiores a los descritos en el hígado o el músculo esquelético, respectivamente (Yamauchi, 2003a). Los efectos fisiológicos que se obtienen de la unión de esta adipocitoquina a sus receptores son, por un lado, favorecer la sensibilidad a la insulina, mediante el aumento de la captación de glucosa y de la oxidación de AGL, y mediante la reducción de la gluconeogénesis, y por otro lado, ejercer un efecto antiinflamatorio que mantiene un equilibrio con otras citoquinas segregadas por el tejido adiposo.

Existen numerosas evidencias que sugieren que son necesarios ciertos niveles de adiponectina para mantener la homeostasis energética y prevenir enfermedades metabólicas. Se ha demostrado

que bajos niveles de adiponectina se asocian de forma independiente con el síndrome metabólico, siendo dicha asociación incluso más fuerte que la que presentan otros marcadores inflamatorios (Matsushita 2006). También se ha observado que la administración exógena de adiponectina a individuos obesos aumenta la sensibilidad a la insulina, efecto asociado a una disminución de los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos (Hotta, 2001; Fruebis, 2001).

Además de las acciones metabólicas mediadas por la AMPK, la adiponectina posee un potente efecto antiinflamatorio y antiaterogénico (Yamauchi, 2003b; Okamoto, 2002) que la convierten en uno de los mejores aliados del organismo para combatir los desequilibrios metabólicos propios del síndrome metabólico.

Aunque tradicionalmente se ha considerado al músculo esquelético como el lugar principal de resistencia a insulina, hoy está ampliamente aceptado que el sitio primario de ésta es en realidad el tejido adiposo (Arner, 2003; Sánchez-Recade 2001).

Se ha postulado que la adiponectina estimula la sensibilidad a insulina disminuyendo la producción hepática de glucosa, contribuyendo así, a una mejor regulación de la glucemia. Estudios en humanos correlacionan los niveles de adiponectina y la supresión basal de la producción de glucosa mediada por insulina (Stefan, 2003). Además, la hipoadiponectinemia está asociada en humanos con la resistencia a la insulina (Weyer, 2001; Kern, 2003), a la resistencia a la insulina en diabetes gestacional (Ranheim, 2004), a diabetes asociada a lipodistrofia (Kosmiski, 2003) y a diabetes tipo 2 (Hotta, 2000). Un factor a destacar es que los niveles de adiponectina son bajos en individuos resistentes a la insulina independientemente de que sean obesos (Abbasi, 2004). Estos datos sugieren que la hipoadiponectinemia contribuye a los cambios en la regulación de la homeostasis de la glucosa y al descenso en la sensibilidad hepática a la insulina observados durante la diabetes. Estas evidencias de la relación de la hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes vienen además confirmadas por estudios genéticos.

En ellos, se han asociado diferentes polimorfismos que provocan hipoadiponectinemia con el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes. El locus donde se codifica la adiponectina se ha asociado con la diabetes (Vasseur, 2003). Además, estudios más recientes demuestran que los niveles bajos de adiponectina predicen el riesgo de padecer diabetes tipo 2, incluso en ausencia de otros marcadores de resistencia a insulina (Lindsay, 2002; Spranger, 2003). Otras evidencias de la clara relación entre adiponectina y sensibilidad a la insulina son los efectos de la insulina sobre los niveles de adiponectina circulante. Se ha demostrado *in vivo* que la insulina disminuye los niveles de adiponectina tanto en humanos como en ratones (Combs, 2001; Yu, 2002). Resultados similares se han obtenido al tratar con insulina adipocitos *in vitro* (Halleux, 2001; Fasshauer, 2002; Motoshima, 2002).

Por otro lado, se ha encontrado que los pacientes diabéticos tipo 1 presentan niveles mayores de adiponectina (Imagawa, 2002). Así pues, estos datos sugieren que la hiperinsulinemia podría tener un impacto negativo en los niveles de adiponectina circulante lo cual llevaría a resistencia a la insulina. Sin embargo, y debido a que la hiperinsulinemia suele ir acompañada de resistencia a la insulina *in vivo*, es difícil establecer por separado cuál es la contribución de los niveles de adiponectina y de insulina en el desarrollo de resistencia a la insulina. En cualquier caso, estudios en primates indican que el descenso en los niveles de adiponectina precede al desarrollo de la hiperinsulinemia (Hotta, 1998; Hotta, 2001) indicando que el descenso en los niveles de adiponectina puede ser una causa y no una consecuencia de la hiperinsulinemia.

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α):

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina multifuncional de 17 kDa, producida por muchos tipos celulares de mamíferos, que fue identificada inicialmente como un factor capaz de promover la regresión de ciertos tumores (de ahí su nombre), y que ha sido relacionada con la caquexia (reducción patológica de la masa muscular y adiposa) y con la resistencia a la insulina en la obesidad (Ryden, 2007). Los niveles séricos de TNF- α están elevados en estados caquéticos asociados a ciertos tipos de infección y cáncer, aunque los mecanismos que explican esta relación siguen sin conocerse bien (Ryden, 2007). El papel del TNF- α en la resistencia a la insulina en la obesidad se mostró por primera vez en 1993, cuando se publicó que la producción de TNF- α en el tejido adiposo estaba incrementada en varios modelos de obesidad y diabetes de tipo 2 en roedores, y que la neutralización del TNF- α con anticuerpos específicos mejoraba la resistencia a la insulina en ratones obesos (Hotamisligil, 1993). Asimismo, se ha descrito que, en ratones, la deficiencia en TNF- α o sus receptores protege frente a la resistencia a la insulina asociada a la obesidad dietética y genética por deficiencia en leptina (Uysal, 1997), aunque han habido resultados contradictorios al respecto (Schreyer, 1998).

El tejido adiposo es una fuente importante de TNF- α , que es producido por adipocitos y macrófagos de la fracción estromo-vascular. Esto posiciona bien al TNF- α para ejercer efectos autocrinos/paracrinos en el tejido adiposo, de hecho, hay evidencia de que, a diferencia de lo que ocurre en roedores, en humanos el TNF- α de origen adiposo no es secretado a la circulación, sino que sólo actuaría como una señal local (Mohamed-Ali, 1997). El TNF- α tiene numerosos efectos de carácter diabetogénico sobre las células adiposas:

- 1) Reduce la expresión de genes involucrados en la acción de la insulina, incluyendo el transportador de glucosa GLUT4, el propio receptor de insulina y el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1).

2) Atenúa la señalización por insulina al inhibir la autofosforilación y actividad del receptor de insulina así como la actividad del IRS-1.

3) Inhibe factores de transcripción necesarios para la diferenciación adipocitaria y la lipogénesis y la sensibilidad a la insulina en los adipocitos (PPAR γ y C/EBP).

4) Estimula la lipólisis basal en adipocitos, al suprimir la expresión de la perilipina (una proteína que, en su forma no fosforilada, recubre las gotas lipídicas intracelulares dificultando el acceso de las lipasas) y, en roedores, también la de la proteína G antilipolítica Gai (Ryden, 2007). La estimulación de la lipólisis puede incrementar los niveles de ácidos grasos libres en suero, que tienen un efecto deletéreo sobre la sensibilidad a la insulina (Wilding, 2007).

El papel del TNF- α en la resistencia a la insulina en la obesidad humana es controvertido. Estudios iniciales concluyeron que la expresión de TNF- α en el tejido adiposo está aumentada en humanos obesos, se normaliza con la pérdida de peso y correlaciona directamente con indicadores de resistencia a la insulina (Hotamisligil, 1995), similar a lo descrito en roedores. Pero otros estudios concluyen que en humanos la expresión adiposa de TNF- α no correlaciona con indicadores de resistencia a la insulina y sólo está incrementada en la obesidad mórbida (Koistinen, 2000). La infusión de anticuerpos anti-TNF- α no mejoró la sensibilidad a la insulina en humanos con diabetes de tipo 2, aunque se ha señalado que esto puede deberse a una vida media corta de los anticuerpos usados, o a la incapacidad de estos anticuerpos de adentrarse en el tejido adiposo (Ryden, 2007). Los defensores de un papel del TNF- α en la resistencia a la insulina en la obesidad humana también destacan el hecho de que los fármacos antidiabéticos de la familia de las tiazolidinedionas inhiben la expresión del TNF- α y la señalización por TNF- α en el tejido adiposo, entre otros efectos (Ryden, 2007). Variantes del gen para el TNF- α se han encontrado asociadas a la obesidad y la resistencia a la insulina en la obesidad en algunos estudios genéticos en humanos, pero no en todos en los que se ha examinado (Rosmond, 2003; Dahlman, 2007).

DIABETES MELLITUS

La DM es un conjunto de trastornos metabólicos caracterizados por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia), ocasionados por defectos en la secreción de insulina, trastornos de su función o más frecuentemente de ambos.

La hiperglucemia crónica propia de la diabetes se asocia con daño, disfunción o fallo de varios órganos, especialmente vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios.

La mayoría de los pacientes que presentan diabetes durante las dos primeras décadas de la vida entran en la categoría de diabéticos insulino-dependientes; debido a la disminución rápida de las reservas endógenas de insulina, son propensos a la cetosis y, con un comienzo más bien abrupto, presentan síntomas clínicos evidentes tales como la poliuria, polidipsia, adelgazamiento y astenia. Sin embargo, el espectro clínico de la diabetes también incluye formas más leves con inicio lento, y sintomatología clínica menos evidente.

En 1995 la AAD creó un comité de expertos para modificar los criterios diagnósticos y clasificación de la DM (AAD, 2013). Estos criterios han sido aceptados tanto por el Grupo de Expertos en DM de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como por el Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación en *Diabetes Mellitus* (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification on *Diabetes Mellitus*, 1999).

Criterios de diagnóstico de la DM (AAD, 2013):

1. A1C >6.5%. La prueba se debe realizar en un laboratorio que utilice un método estandarizado según el National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), certificado y estandarizado para el Diabetes Control and Complications trial.

2. Glucemia en ayunas (GA) ≥ 126 mg/dl (7 mmol/L). El ayuno se define como la no ingesta calórica durante por lo menos 8 horas.
3. Glucemia 2 horas posprandial (GP) ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). La prueba debe ser realizada con las indicaciones de la OMS, con una carga de hidratos de carbono equivalente a 75 g glucosa anhidra disuelta en agua.
4. Glucemia al azar ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis de hiperglucemia.
5. En ausencia de hiperglucemia inequívoca, el resultado debe ser confirmado por repetición de la prueba.

Las principales novedades introducidas en los nuevos criterios diagnósticos son dos: La disminución del umbral diagnóstico de la glucemia en ayunas a 126 mg/dl (7 mmol/l) y dejar de utilizar la SOG como prueba diagnóstica de rutina. Esta prueba quedaría restringida a los pacientes con unos valores de glucosa plasmática entre 110 y 126 mg/dl (entre 6,1 y 7 mmol/l) y/o obesos, con historia familiar de diabetes o con títulos altos de hemoglobina glicosilada (HbA1C) (Okubo, 1999).

Existe un grupo intermedio de individuos con niveles de glucosa que, aunque no cumplen los criterios de diagnóstico, son altos como para considerarlos normales: Cuando los valores de glucosa plasmática en ayunas son mayores o iguales a 110 mg/dl pero menores a 126 mg/dl y cuando la glucosa plasmática tras la SOG es mayor o igual a 140 mg/dl pero menor de 200 mg/dl, se define como intolerancia a la glucosa.

La determinación de anticuerpos contra antígenos de la célula β permite detectar personas asintomáticas con riesgo de desarrollar DM 1. Sin embargo, no se recomienda el cribado sistemático de la población infantil y en general de los grupos con mayor riesgo

(familiares de primer grado), excepto en el contexto de estudios prospectivos controlados.

El motivo fundamental para no recomendar este cribado es la ausencia actual de tratamientos efectivos que impidan la progresión de la enfermedad. En cambio, la determinación de estos anticuerpos en el momento del diagnóstico puede ser útil en los casos en que se dude del tipo de DM por las características de presentación clínica (Fernández, 1998).

Historia:

La historia de la lucha contra la diabetes se remonta a 3.500 años atrás cuando los médicos egipcios describen la enfermedad y comienzan a recetar los primeros medicamentos buscando paliar sus síntomas. Desde entonces, investigadores de toda las épocas han volcado sus esfuerzos en descubrir primero qué causaba la enfermedad y después, mucho mas recientemente, cómo podía evitarse. Esta historia esta llena de hipótesis, observaciones e incógnitas, muchas de las cuales siguen sin resolverse (Giménez, 2003).

En las culturas orientales, el dato más antiguo que se conserva sobre la diabetes se debe a Súsruta, médico hindú que en el siglo V aC. observó los síntomas de esta enfermedad, a la que llamó “de ricos” ya que afectaba a sobre todo a personas obesas, grandes consumidoras de dulces y arroz.

La comercialización masiva del azúcar ha sido considerada como la causa más probable del cambio de la salud en las sociedades europeas, generando el concepto de “enfermedades modernas”.

En torno al año 1874, el Primer Ministro británico, Gladstone, abolió el pago de tasas existente para la producción del azúcar, con lo cual el precio del azúcar se redujo y permitió que cualquier ciudadano pudiera comprarlo. Por lo tanto, se podría culpar en cierto

modo a Gladstone del concepto de “enfermedades modernas”.

La diabetes en algunos idiomas:

El nombre médico de esta enfermedad básicamente en todas las lenguas romances es *Diabetes Mellitus*, cuya raíz léxica proviene del griego y del latín, respectivamente. La palabra diabetes tiene su origen en un vocablo griego (diabeinonen) que puede traducirse como algo así como “pasar a través con fuerza”. El vocablo mellitus es de origen latino y significa “dulce como la miel”. La orina de una persona con diabetes contiene demasiado azúcar (glucosa), lo que fue evidenciado científicamente a mediados del siglo XVII por Thomas Willis (1621-1675) cuando probó el sabor de la orina de una persona con diabetes, y la describió como “dulce como la miel”.

En algunas lenguas de origen germánico la mención de dicha enfermedad incluye directamente la palabra “azúcar”, por ejemplo:

- Sukr bi-damm, azúcar en sangre (árabe).
- Sockersjuka, enfermedad del azúcar (sueco).
- Zuckerkrankheit, enfermedad del azúcar (alemán).
- Maraz ghand, enfermo de azúcar (persa) (Figuerola, 2003).

La diabetes en la antigüedad:

El arqueólogo y novelista alemán George Ebers fue el que halló la primera referencia de los síntomas de la diabetes. En el año 1873 compró a un comerciante de Tebas (la actual ciudad de Luxor) un papiro escrito en el 1553 aC., en el que se documentaban conocimientos de médicos del antiguo Egipto. En ese papiro, atribuido a un eminente médico y sacerdote de la época, se habla de enfermos que adelgazan, tienen hambre y sed constantes y orinan mucho. Como médico recomendaba un cocimiento de cuatro días

con huesos, cerveza, trigo, hojas de menta y sangre de hipopótamo y como sacerdote aconsejaba ofrendas y sacrificios a los dioses.

En este periodo de la antigüedad, hay que mencionar, además del papiro de Ebers, los libros chinos que hacen descripciones parecidas a la del papiro egipcio en textos de dos mil años de antigüedad y la antigua literatura de los vedas, en donde se describe la orina pegajosa, con sabor a miel y que atrae a las hormigas.



Figura 8. Papiro de Ebers.

El término diabetes es atribuido a Demetrius de Apamagia por unos y a Apolonio de Menfis, por otros. El sentido del término (a partir del griego dia= a través y beinen= pasar) correspondería al de un estado de debilidad, sed y poliuria. Apolonio creía que era una forma de hidropesía.

Pablo de Aegina refinó aún más el diagnóstico de la “dypsacus”, diabetes. La asoció a un estado de debilidad de los riñones, con un exceso de micción que conducía a la deshidratación. Prescribió un remedio a base de endibias, lechuga y trébol en vino tinto, con decocciones de dátiles y mirto, para beber en los primeros estadios

de la enfermedad, seguido de cataplasma a base de vinagre y aceite de rosas sobre los riñones. Previno sobre el uso de diuréticos, pero permitió la sangría.

Galeno pensaba que la diabetes era una enfermedad muy rara, y utilizó términos alternativos como “diarrea urinosa” y “dypsacus”, este último para enfatizar la extrema sed asociada a la enfermedad.

En la medicina oriental destaca Súshruta, el padre de la medicina hindú, quien describió la diabetes y llegó incluso a diferenciar una diabetes que se daba en los jóvenes, que conducía a la muerte, y otra en personas de cierta edad, de modo que la medicina india ya distinguía dos formas de diabetes, una que se da en personas delgadas y jóvenes y otra, en personas mayores y obesas, y que claramente corresponden a las diabetes de tipo 1 y de tipo 2 de nuestros días. Súshruta, escribió una amplia colección de tratados de cirugía, patología, anatomía e incluso de psicología y deontología. Daba amplias instrucciones respecto al diagnóstico: interrogaba al paciente y lo examinaba minuciosamente; observaba el pulso y degustaba la orina para detectar la diabetes. Los miembros de la escuela de Súshruta, describieron con el sabor dulce y la consistencia viscosa de la orina, otros síntomas como halitosis, somnolencia, problemas digestivos y respiratorios, asociados con alta frecuencia a obesidad.

Aproximadamente en la misma época que la medicina hindú, los médicos chinos también describen la diabetes, el hecho de que la orina de los diabéticos atrae a las hormigas, la propensión a desarrollar abscesos y una enfermedad pulmonar, probablemente la tuberculosis. Para el tratamiento de ésta recomendaban evitar el vino y los cereales, lo que les acercaría un poco al tratamiento racional.

La medicina árabe puede dividirse en dos épocas: una primera que se desarrolla en Egipto bajo la influencia de los nestorianos, quienes difundieron la medicina griega, y una segunda en la que los médicos árabes, aun manteniendo un gran respeto por la medicina de Hipócrates y Galeno empiezan a imprimir a la medicina un sello

personal (Peumery, 1993).

Avicena, autor del Canon, traducido al latín y primer exponente de la medicina árabe, describe la diabetes y el coma hipoglucémico, recomendando un tratamiento de semillas de alhova y cedro, ambas con propiedades hipoglucemiantes.

El médico griego nacido en Capadocia, Areteo, acuñó el término “diabetes” para designar una enfermedad que ya se conocía desde miles de años antes. Utilizó la palabra griega que sugnifica “fluye a través”, en alusión a uno de sus síntomas más característicos. Se atribuye a Areteo la denominación del estado clínico caracterizado por la emisión incesante de orina. En su obra “enfermedades agudas y crónicas”, acuñó el término diabetes, para detallar la condición que llevaba a un aumento de cantidad de orina (Kahn, 2006).

Renacimiento y siglo XVI:

A partir del siglo XVI comenzaron a suceder descubrimientos médicos, principalmente en Europa.

El médico suizo Philippus de Aureolus Teophrastus Bombastus Von Hohenheim, más conocido por el nombre de Paracelso (1493-1541), escribió que la orina de los diabéticos contenía una sustancia anormal que al evaporar la orina quedaba como residuo de color blanco, creyendo que se trataba de sal y atribuyendo la diabetes a una deposición de ésta sobre los riñones causando la poliuria y la sed de estos enfermos.

El inglés Thomas Willis (1621-1675), fue el primer médico occidental que probó la orina de un diabético, algo que practicaban los hindúes 2.500 años antes, encontrándola dulce, y estableciendo así por primera vez una relación entre azúcar y diabetes.

El médico escocés William Cullen fue el responsable, en 1769, de la introducción del término “mellitus” para designar el tipo de diabetes más común frente a la insípida. Lo hizo en su obra *Sinopsis Nosologicae Methodicae*, una excelente y elaborada clasificación de las enfermedades humanas.

Desde la antigüedad, los médicos intentaron combatir la diabetes a base de dietas. Muchos tenían claro que una alimentación “adecuada” contribuiría a paliar los síntomas de la enfermedad, pero cada uno recomendaba aquellos alimentos que en su opinión eran los más convenientes. Un médico escocés, John Rollo, puede considerarse el primero en proponer una dieta con base científica para los enfermos diabéticos. En su ensayo “Causas de la diabetes mellitus”, publicado en 1798, analiza el caso de un paciente, el capitán Meredith.

Siglo XVI:

Mathew Dobson (1735-1784) médico inglés de Liverpool hizo por primera vez estudios con pacientes. Después de tratar un reducido grupo de pacientes demostró la existencia de azúcar en sangre y orina de dichos pacientes. Calentaba la orina hasta que se evaporaba. Los residuos resultantes los describió: “de color blancuzco, con forma granulada, se desmenuzan fácilmente con los dedos y tienen un olor dulce como el azúcar”. Dejó constancia de sus descubrimientos en su ensayo “Experimentos y observaciones en la orina de los diabéticos”.

Siglo XIX:

Johann Meter Frank (1745-1821), médico vienés considerado como padre de la medicina social, describió por primera vez la diabetes insípida, diferenciándola de la mellitus. Desarrolló un test para diagnosticar la enfermedad consistente en la fermentación alcohólica del azúcar urinario. Diferenció las formas agudas de las crónicas, reconociendo una diabetes insidiosa, con orina azucarada pero sin poliuria, y una diabetes intermitente.

Una de las mayores figuras fue el fisiólogo francés Claude Bernard (1813-1878), que realizó importantes descubrimientos incluyendo la observación de que el azúcar que aparece en la orina de los diabéticos se podía formar en el hígado y secretarse a la

circulación, lo que le llevó a concluir que el hígado tiene un papel fundamental en la fisiopatología de la diabetes. También demostró que la hiperglucemia era causada por un exceso de glucosa.

En el siglo XIX, la investigación centró su atención en el estudio del páncreas, cuya función venía intrigando a los médicos desde mediados del siglo XVII. Se sabía que el páncreas segregaba una sustancia que iba al intestino y, también, que si se le extirpaba esta víscera a un perro, éste desarrollaba síntomas análogos a los de la diabetes.

Paul Langerhans, por iniciativa de Rudolf Virchow, emprendió el estudio histológico del páncreas, descubriendo en el tejido glandular la presencia de unos grupos de células diferenciadas, diseminadas a modo de islas (1869). Su tesis doctoral sobre los islotes pancreáticos llevaba por título “Contribuciones a la anatomía microscópica del páncreas”. Posteriormente, en 1894, en honor a su descubridor, se denominaron islotes de Langerhans.



Figura 9. Paul Langerhans. La imagen ha sido obtenida del Atlas de diabetes Novo Nordisk.

El médico alemán Adolf Kussmaul (1822-1902) contribuyó al conocimiento de los mecanismos de la diabetes. En 1874 publica un trabajo titulado: "Para el conocimiento de la diabetes" en el que interpreta el coma diabético como consecuencia de una disfunción metabólica, en concreto a la aparición de cetona en la sangre. Describe que el enfermo manifiesta una "gran respiración", que hoy lleva su nombre, además del típico olor a acetona del aliento.

Las funciones del páncreas como glándula capaz de reducir los niveles de glucosa en sangre comenzaron a aclararse en la segunda mitad del siglo XIX. Fueron el ruso Oscar Minkowski (1858-1931) y el alemán Joseph Von Mering (1849-1908) en 1889, quienes pusieron de manifiesto esta asociación aunque fuese de manera casual. Extirparon el páncreas completo a un perro para estudiar la reabsorción de grasa, comprobando además que el animal orinaba mucho más y que la orina contenía azúcar, llegando a la conclusión de que el páncreas producía una sustancia inhibidora de la diabetes.

Siglo XX:

En los últimos años del siglo XIX y los primeros del XX, se realizaron grandes esfuerzos para aislar la insulina. Uno de los primeros investigadores en obtener resultados fue el alemán George Ludwig Zuelzer (1870-1949) quien obtuvo extractos de páncreas de animales, realizando los primeros ensayos terapéuticos en humanos. El preparado que Zuelzer elaboró a partir del páncreas de ternera fue comercializado por los laboratorios Schering de Berlín con el nombre de Acomatol y demostró ser eficaz en el tratamiento del coma diabético. El mayor problema comprendía a los efectos secundarios que producía: vómitos, fiebre alta, convulsiones, etc... A pesar de todo, estos resultados fueron publicados en 1908.

Nicolae Paulesco fue un fisiólogo y bioquímico rumano interesado en la investigación del páncreas y la diabetes que consiguió aislar una sustancia a la que llamó pancreatina: la hormona pancreática antidiabética. Inyectó esta hormona a un perro diabético

consiguiendo una reducción temporal de los niveles de glucosa en sangre. Sus experimentos pusieron de manifiesto que la inyección de este extracto también disminuía los niveles de glucosa y acetona en la orina. Publicó los resultados en el año 1921 en francés. Sin embargo sus trabajos remitidos a la Sociedad Rumana de Biología, fueron ignorados (Schadewaldt, 1975).

En 1921, Frederick Grant Banting y Charles Herbert Best (estudiante que trabajaba como auxiliar en el Instituto Fisiológico) en Toronto, intentaron aislar la sustancia producida por las células del páncreas, a partir de experimentos realizados con perros. El proceso consistía en ligar el conducto pancreático, dejar transcurrir algunas semanas para que el tejido acinar degenerara, extirpar la glándula y preparar un extracto del tejido restante del islote. Los islotes, al no estar relacionados con la producción de jugo digestivo no degeneraban, en cambio sí se necrosaba el resto del páncreas, y con él, las enzimas digestivas que rompían la molécula de dicha sustancia. Los extractos pancreáticos que inyectaron a los perros a los que les habían inducido la diabetes disminuían sus niveles de glucemia: Se había conseguido aislar el factor antidiabético de los islotes de Langerhans. El descubrimiento se presentó en una conferencia histórica titulada “Secreción interna del páncreas” en la universidad de Toronto.

Los primeros problemas que se abordaron fueron, reducir el periodo de tiempo que se necesitaba para producir el extracto antidiabético, en un inicio denominado “isletina”, y eliminar las impurezas que producían efectos indeseables asociados, como abscesos en el lugar de la inyección. La primera cuestión se consiguió utilizando páncreas fetales de becerro. James Bertram Collip, un bioquímico de gran experiencia, contribuyó a su purificación.

En 1921, Leonard Thomsom, un chico diabético de 14 años recibió la primera inyección de “isletina” con resultados espectaculares. Logró sobrevivir catorce años a su enfermedad. Poco después, esta sustancia recibió el nombre de insulina y se identificó como una hormona.

La creciente demanda, ante los éxitos obtenidos, obligó en 1923 a los laboratorios farmacéuticos y grandes firmas farmacéuticas europeas a obtener este preparado según el procedimiento descrito por Banting, Best y Collip, bajo el control del Comité insulínico independiente (Banting, 1922).

La insulina se administraba varias veces al día mediante inyecciones que los diabéticos aprendieron a inyectarse personalmente, hasta aparecer la insulina retardada; a partir de entonces, en la mayoría de los casos, sólo se necesitaba una inyección diaria.

El descubrimiento de la insulina producido en Canadá se extendió al resto del mundo. Un médico español nacido en Barcelona, Rosendo Carrasco y Formiguera, fue el primero en introducir la insulina en España y también en Europa. El primer paciente diabético tratado en España lo fue sólo un año más tarde del descubrimiento de la insulina, en octubre de 1922.

Un hecho anecdótico en el tratamiento de la diabetes se relaciona con el empleo de las sulfonamidas. Estas sustancias, introducidas en los años 30 por Gerhard Domagk para el tratamiento de las infecciones bacterianas, demostraron tener un efecto hipoglucemiante. En 1953, Hans Frank y Joachims Funchs utilizaron en el sanatorio Auguste-Victoria de Berlín el nuevo preparado sulfamídico de los laboratorios C.H.F. Boehringer para tratar a 50 diabéticos, confirmando su acción antidiabética.

Pocos años después los antidiabéticos orales habían escalado puestos en el tratamiento de esta enfermedad y muchos pacientes pudieron prescindir de las inyecciones diarias de insulina.

Clasificación de la Diabetes:

La clasificación de la DM se puede realizar en base al proceso patógeno que culmina en hiperglucemia, en contraste con criterios previos como edad de inicio o tipo de tratamiento. Las dos formas más importantes son la diabetes tipo 1 (insulinodependiente) y la diabetes tipo 2 (no insulinodependiente).

Durante años la DM se ha clasificado atendiendo solamente a criterios clínicos como son la edad de inicio y la dependencia o no de insulina, en dos grandes categorías: La diabetes juvenil y la diabetes de la edad adulta.

En julio de 1997, la Asociación Americana de Diabetes publicó unos criterios diagnósticos y de clasificación que sustituían a los de la National Diabetes Data Group (NDDG) publicado en 1979 (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

Clasificación de la DM propuesta por la NDDG (NDDG, 1997):

I.- Diabetes tipo 1(DM1):

A.- Mediada por mecanismos inmunológicos.

B.- Idiopática.

II.- Diabetes tipo 2 (DM2).

III.- Otros tipos específicos:

A.- Defectos genéticos de la función de la célula β : MODY 1: 20q12-q13,2 ; HNF-4 α , MODY 2: 7p15-p14; glucocinasa, MODY 3: 12q 24,2; HNF-1 α , MODY 4: 13q12,1; IPF-1, MODY 5: 17 cen-q 21,3; HNF-1 β y MODY 6: 2q32; NEURODI

B.- Defectos genéticos de la acción de la insulina: Tipo A de resistencia a la insulina, Leprechaunismo, Síndrome Rabson-Mendenhall, Diabetes lipoatrófica y Otras.

C.- Enfermedades del páncreas exocrino: Pancreatitis, Pancreatectomía/traumatismo, Neoplasia, Fibrosis quística, Hemocromatosis, Pancreopatía fibrocalculosa y Otras.

D.- Endocrinopatías: Acromegalia, Síndrome de Cushing, Glucagonoma, Feocromocitoma, Hipertiroidismo, Somatostatina, Aldosteronoma y Otras.

E.- Inducidos por drogas o sustancias químicas: Vacor, Pentamidina, Ácido nicotínico, Glucocorticoides, Hormona tiroidea, Diazóxido, Agonistas β -adrenérgicos, Tiacidas, Dilantina, α -interferón y Otros.

F.- Infecciones: Rubéola congénita, Citomegalovirus (CMV) y Otros.

G.- Formas poco frecuentes de diabetes mediadas inmunológicamente: Síndrome "Stiff-man" y Anticuerpos contra receptor anti-insulina.

H.- Otros síndromes genéticos que se asocian a diabetes: Síndrome de Down, Síndrome de Klínenfelter, Síndrome de Turner, Síndrome de Wolfram, Ataxia de Friedreich, Corea de Huntington, Síndrome de Lawrence Moon Bield, Distrofia miotónica, Síndrome de Prader Willi y Otros.

IV.- Diabetes mellitus gestacional

En 2003 estos criterios se revisaron una vez más y de esa manera la clasificación de diabetes incluye cinco clases clínicas (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003):

- 1) DM tipo 1: resulta de la destrucción de las células β -pancreáticas y se caracteriza por un déficit de insulina.
- 2) DM tipo 2: Constituye un trastorno progresivo que se caracteriza por diferentes grados de resistencia a la insulina y disfunción progresiva de las células β , lo que conduce a una falta relativa, y en algunos casos total, de secreción de insulina.

Las características de la diabetes tipo 2 son:

-Se asocia a defectos tanto de la secreción de insulina como de sus efectos fisiológicos.

-Puede aparecer a cualquier edad, aunque lo habitual es que se diagnostique después de los 30 años.

-El 80% de los pacientes son obesos. Puede darse en no obesos, sobre todo en individuos de edad avanzada.

-Los pacientes pueden presentar los síntomas clásicos de la diabetes: polidipsia, poliuria, polifagia y pérdida de peso.

-Los pacientes con diabetes tipo 2 no son propensos a desarrollar cetoacidosis, excepto en periodos de estrés intenso (infecciones, traumatismos, medicaciones o intervenciones quirúrgicas), presentan con frecuencia complicaciones crónicas microvasculares y macrovasculares a causa de la diabetes.

3) Otros tipos específicos de diabetes: debidos a otras causas como por ejemplo: defectos genéticos en la acción de insulina, enfermedades del páncreas exocrino como fibrosis quística, o inducidas por fármacos como los empleados en el tratamiento de la infección por VIH o tras un trasplante. Esta categoría incluye a menos del 3% de las personas con diabetes.

4) Diabetes gestacional (DMG): término que se emplea para describir la intolerancia a glucosa que se detecta por primera vez durante el embarazo. Las mujeres con diabetes conocida antes de la concepción no forman parte de este grupo. La DMG afecta entre el 4 y el 7% de embarazos. Hasta el 50% de mujeres con DMG desarrollan posteriormente diabetes mellitus tipo 2.

5) Prediabetes: incluye los estados antes descritos como glucemia basal alterada (GBA, glucemia basal de 100-125 mg/dl) y tolerancia alterada a la glucosa (TAG, glucemia de 140-199 mg/dl dos horas después de una sobrecarga oral de glucosa –SOG- de 75g). La importancia de esta categoría radica en que representa un factor de riesgo de presentar diabetes y enfermedad cardiovascular

en el futuro. El DPP y otros estudios demostraron que modificando el estilo de vida y los hábitos de alimentación para reducir el peso entre un 5% y un 10% se previene o pospone el inicio de la diabetes en las personas prediabéticas. La ADA recomienda intervenir en el estilo de vida de estas personas. No hay datos suficientes para recomendar de manera sistemática el tratamiento farmacológico a fin de prevenir la enfermedad.

DM Tipo 1:

Suele presentarse de forma brusca y generalmente antes de los 30 años (si bien puede darse a cualquier edad).

Los pacientes que padecen esta enfermedad poseen una susceptibilidad genética determinada, sintetizan antígenos de clase II codificados por el HLA sobre las regiones DR3y DR4.

Estos pacientes sufren una reacción cruzada cuando tienen una enfermedad viral, lo que provoca una destrucción de células β productoras de insulina. Esto es debido a que las células insulares expresan en superficie los antígenos de clase II anteriormente citados condicionando el ataque autoinmune mediado por linfocitos T. Por lo tanto, esto trae como consecuencia la hiperglucemia crónica que la caracteriza. Los pacientes de diabetes tipo 1 dependen de inyecciones subcutáneas diarias de insulina para su supervivencia. Esto refleja la severidad de la deficiencia de insulina, sin la cual, la lipólisis en tejido adiposo se activa incontroladamente, generando altos niveles de ácidos grasos libres los cuales son metabolizados a cuerpos cetónicos en el hígado. Así se produce la cetoacidosis diabética, que conlleva al coma y la muerte del paciente.

Este tipo de diabetes es el resultado de interacciones de diferentes factores, genéticos, ambientales e inmunológicos, cuyo final es la destrucción de las células beta del páncreas y la deficiencia de insulina.

Genéticamente hablando se puede decir que en la susceptibilidad de la diabetes tipo 1 intervienen múltiples genes. En la región HLA del cromosoma 6 encontramos el principal gen de predisposición para el desarrollo de la diabetes tipo 1. Los polimorfismos en el complejo HLA parecen representar 40 a 50% del riesgo genético de sufrir diabetes tipo 1.

DM tipo 2:

Suele presentarse de forma lentamente progresiva después de los 40 años, no tiende a la cetoacidosis y con frecuencia se asocia a la obesidad. Resulta de una combinación de insulino-resistencia con secreción defectuosa de insulina. Esto es debido al descenso de receptores de membrana en la superficie de las células para la insulina.

Generalmente aparece un periodo de homeostasia anormal de la glucosa antes de aparecer la diabetes de tipo II. Esta alteración es conocida como trastorno de la glucosa en ayunas o trastorno de la tolerancia a la glucosa.

Las principales causas que provocan el desarrollo de la diabetes tipo 2 son la resistencia a la insulina y la secreción anormal de ésta.

En cuanto a los fundamentos genéticos de la diabetes tipo 2 cabe destacar que existe un gran componente genético. Este tipo de diabetes es poligenética y multifactorial, ya que a parte de la susceptibilidad genética existen otros factores, como puede ser la obesidad, nutrición o actividad física, que pueden modular el fenotipo.

En la actualidad existen dos diferencias en la clasificación de la diabetes con respecto a clasificaciones previas. La primera es que no se utilizan los términos *Diabetes Mellitus* insulino dependiente y *Diabetes Mellitus* no insulino dependiente puesto que muchos individuos que padecen diabetes de tipo 2 al final acaban requiriendo

tratamiento con insulina para el control de la glucemia, por lo que se generaban confusiones considerables al utilizar el término *Diabetes Mellitus* no insulino dependiente. La segunda diferencia es que la edad ha dejado de utilizarse debido a que, aunque la diabetes tipo 1 se desarrolla con más frecuencia en personas menores de 30 años, puede producirse un proceso de destrucción autoinmunitaria de las células beta a cualquier edad. También es importante considerar que aunque la diabetes tipo 2 se desarrolle con el paso de los años, puede darse también en niños, en especial en adolescentes obesos. (Fauci, 2009).

Epidemiología:

La prevalencia mundial de la diabetes ha aumentado impresionantemente en los últimos años. Según la Organización Mundial de la Salud en el mundo hay más de 364 millones de personas con diabetes.

La prevalencia de ambos tipos de diabetes, es decir, tipo 1 y tipo 2, aumenta a nivel mundial, pero la de tipo 2 lo hace de una manera mucho más rápido debido al aumento de la obesidad en la población y la disminución de la actividad física conforme se industrializa cada vez un mayor número de países. Es semejante en varones y mujeres en todos los límites de edad, pero levemente mayor en varones de 60 años o más.

Las estimaciones a nivel mundial indican que en el año 2030 el número mayor de diabéticos tendrá 45 a 64 años de vida. Se calcula que en 2004 fallecieron 3,4 millones de personas por diabetes. Casi la mitad de esas muertes corresponden a personas de menos de 70 años, y un 55% a mujeres.

La OMS prevé que las muertes por diabetes se multipliquen por dos entre 2005 y 2030.

Patogenia:

Hay dos mecanismos diferentes que están implicados en la patogenia de las complicaciones tardías de la diabetes. Dichos mecanismos son:

1) Formación de productos terminales de glucosilación avanzada (AGE): estos productos se forman como resultado de reacciones no enzimáticas entre los precursores dicarbonil derivados de la glucosa intracelular con el grupo amino de proteínas tanto intra como extracelulares. Como resultado de dicha reacción se obtienen las llamadas bases de Schiff.

Cuando la glucosa se une a proteínas de larga vida como puede ser el colágeno, se producen productos de glicosilación avanzada (PGA). Dichos productos poseen dos propiedades:

- a) Se adhieren a proteínas y lipoproteínas. Esto provoca que en las arterias de mayor tamaño se atrapen LDL favoreciendo la acumulación de colesterol dando lugar a la formación de placas de ateroma, arterioesclerosis. En la microcirculación los PGA hacen que la albumina se una a la membrana basal originando engrosamiento de las membranas basales de los pequeños vasos originando arterioesclerosis hialina y microangiopatía diabética.
- b) Se unen a células con receptores específicos como células endoteliales favoreciendo la adhesión de plaquetas, macrófagos y linfocitos por medio de la síntesis de citoquinas y factores de crecimiento, induciendo la síntesis de matriz extracelular por los fibroblastos.

2) Hiperglucemia intracelular con alteraciones de las vías de los polioles: en las células que no necesitan insulina para el transporte de la glucosa la hiperglucemia induce un aumento de la glucosa intracelular, que es entonces metabolizada por la aldosa reductasa a sorbitol, un politol y finalmente a fructosa.

Estas células son: pericitos, células de Schwann, células del cristalino y células tubulares renales.

El síndrome metabólico se puede considerar como un desorden metabólico que agrupa toda una serie de alteraciones metabólicas y funcionales estrechamente relacionadas entre sí, incluyendo como principales: obesidad de distribución central, resistencia a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia aterogénica, con elevación de triglicéridos y disminución de colesterol-HDL e hipertensión.

Todos los componentes del síndrome metabólico constituyen, de forma independiente, factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y diabetes de tipo 2, razón por la que la manifestación conjunta de varias de estas anomalías metabólicas en un mismo individuo, dando lugar a este síndrome, incrementa de forma importante el riesgo de padecer estas patologías. La presencia del síndrome metabólico se ha asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes de tipo 2 y de 2 a 3 veces en la de enfermedad cardiovascular (Zimmet, 2001; Eckel, 2005).

Como la insulina es una de las hormonas anabólicas principales del organismo, el déficit de insulina conduce a un estado catabólico que afecta tanto al metabolismo de la glucosa como al de las grasas y proteínas. En esta destrucción metabólica interviene obligatoriamente la secreción de hormonas de contrarregulación (glucagón, hormona de crecimiento y adrenalina). No sólo se interrumpe la formación de depósitos de glucógeno en el hígado y en los músculos, sino que la glucogenólisis agota las reservas existentes. La consecuencia es una hiperglucemia aguda que excede la capacidad de reabsorción renal, ocasionando glucosuria. La glucosuria induce una diuresis osmótica, y por tanto, poliuria, causando una gran pérdida de agua y electrolitos. La pérdida de agua por el riñón combinada con la hiperosmolaridad secundaria a la hiperglucemia, tiende a producir una pérdida del agua intracelular, estimulando los osmorreceptores de los centros de la sed del cerebro, apareciendo así una sed intensa, lo que se conoce como polidipsia.

El déficit de insulina hace que el anabolismo estimulado por ésta se transforme en un catabolismo de las grasas y las proteínas.

Se produce proteólisis, y el hígado moviliza los aminoácidos gluconeogénicos, utilizándolos para fabricar glucosa. El catabolismo de las proteínas y las grasas favorece la aparición de un equilibrio energético negativo que, a su vez, conduce a un aumento del apetito (polifagia). A pesar del mayor apetito, los efectos catabólicos prevalecen, por lo que el paciente pierde peso y presenta debilidad muscular.

La cetoacidosis diabética es una complicación seria de la diabetes tipo 1, aunque también puede ocurrir en la diabetes tipo 2. Estos pacientes presentan un marcado déficit de insulina, y la liberación de la hormona catecolaminérgica adrenalina bloquea cualquier acción residual de la insulina y estimular la liberación de glucagón. El déficit de insulina estimula la lipoproteín lipasa, lo que conduce a una degradación de los depósitos de grasa, con el consiguiente incremento de las concentraciones de ácidos grasos libres. Cuando estos ácidos grasos libres alcanzan el hígado, son esterificados a acetil CoA adiposa. La oxidación de las moléculas de acetil CoA a adiposa dentro de la mitocondria hepática produce cuerpos cetónicos. Si la deshidratación dificulta la eliminación urinaria de las cetonas, aumenta la concentración de iones hidrógeno en el plasma, con la consiguiente cetoacidosis metabólica (Kumar, 2008).

Deterioro cognitivo relacionado con la Diabetes:

Los factores de riesgo asociados con el deterioro cognitivo son diversos e incluyen: edad, género, antecedentes familiares, grado de escolaridad y otros casi siempre relacionados con enfermedad cardio y cerebrovascular que favorecen alteraciones por hipoperfusión, desmielinización y lesiones isquémicas subcorticales de sustancia blanca. Entre los factores cerebrocardiovasculares destacan: *Diabetes Mellitus*, hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo, hiperhomocisteinemia y concentraciones elevadas de proteína C reactiva de alta sensibilidad (Cicconetti, 2004).

Las personas con DM tienen mayor riesgo de decremento de la función cognitiva. El deterioro cognitivo leve se denomina encefalopatía diabética o disfunción cognitiva diabética e, incluso, se ha diferenciado en encefalopatía diabética primaria y secundaria. La primaria causada por hiperglucemia y alteración en la acción de la insulina, relacionada con el tiempo de evolución de la hiperglucemia y se asocia con pérdida neuronal apoptótica y deterioro cognitivo; en contraparte, la encefalopatía diabética secundaria parece ser resultado de enfermedad microvascular subyacente o consecuencia de hipoglucemia (Sima, 2004; Biessels, 2007). En la actualidad existe mayor interés en el deterioro cognitivo debido al avance reciente en técnicas de imagen y en pruebas neurocognitivas; sin embargo, aún se conoce poco su fisiopatología (Kodl, 2008).

La DM tipo 2 se asocia con alteraciones en las funciones cerebrales que, a su vez, implican: deterioro cognitivo, demencia, depresión y enfermedad cerebrovascular (Bauduceau, 2005). El deterioro cognitivo también puede ser consecuencia de depresión, hipertensión y enfermedad cardio y cerebrovascular (Launer, 2005; Messier, 2005). Las personas con *Diabetes Mellitus* tipo 2 tienen mayor tasa de declinación de funciones cognitivas e incremento de hasta 15 veces en el riesgo de deterioro cognitivo e, incluso, demencia (Allen, 2004; Cuckierman, 2005). La mayor parte de los estudios indica que las alteraciones cognitivas en pacientes con DM tipo 2 involucran múltiples factores mediante igual número de mecanismos fisiopatológicos que incluyen, principalmente, glucemia, perfil de lípidos, presión arterial, insulinemia, medicamentos hipoglucemiantes y complicaciones crónicas micro y macrovasculares (Liang, 2006).

Desde el punto de vista neuropsicológico se ha descrito que el patrón de deterioro cognitivo en personas con DM sugiere una disfunción frontal subcortical, como se observa en la enfermedad de pequeño vaso cerebral (Qiao, 2006). Los dominios afectados con mayor frecuencia en el diabético tipo 2 incluyen: atención, función ejecutiva, memoria verbal y velocidad de procesamiento, principalmente, respetando funciones visuoespaciales, de atención, semánticas y de lenguaje (Awad, 2004; Kouta, 2006).

En estudios clínicos y en modelos animales se ha documentado que la DM induce trastornos cognitivos y alteraciones en la potenciación a largo plazo en el hipocampo y que esta potenciación es regulada por propiedades intrínsecas de los receptores de glutamato, particularmente del subtipo NMDA (Trudeau, 2004). También se ha estudiado la relación entre DM y cambios en la cognición a través de alteraciones en la estructura y función de la barrera hematoencefálica (Huber, 2008).

Debido al gran número de factores potencialmente involucrados en el decremento de las funciones cognitivas en la DM se requieren estudios que incluyan una batería de pruebas neuropsicológicas, de laboratorio (con hemoglobina glucosilada), insulina, perfil de lípidos y resonancia magnética, de preferencia con análisis volumétrico. Un estudio controlado con dichas características reportó menor gravedad de las lesiones en la resonancia magnética con estatinas, mientras que como factor de riesgo se encontró a la hipertensión arterial e insulina basal; sin embargo, sus aportaciones no parecen ser clínicamente relevantes concluyéndose en lo multifactorial del deterioro cognitivo en DM tipo 2 (Manschot, 2007).

Está demostrado que la insulina y el receptor de insulina participan de manera importante en la función cognitiva; sin embargo, se desconocen los mecanismos precisos (Dou, 2005). Con base en la evidencia en los últimos se sugiere que las alteraciones vinculadas con la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial pudieran jugar un papel relevante en el deterioro cognitivo en pacientes con DM tipo 2 (Starr, 2007). Las concentraciones tóxicas de insulina afectan negativamente la función neuronal y supervivencia y se ha demostrado que la elevación de la concentración de insulina periférica incrementa de forma aguda su concentración en el líquido cefalorraquídeo (Neumann, 2008).

En el sistema nervioso central la insulina y los receptores de insulina se encuentran en regiones específicas, con funciones dependientes de la localización; los mecanismos son distintos a la regulación directa de la glucosa periférica. El binomio insulina-receptor de insulina en el hipotálamo participa en la homeostasis del gasto

energético y los que se localizan en el hipocampo y corteza cerebral se relacionan con funciones cognitivas (Zhao, 2004).

Biomarcadores:

1) Homocisteína:

El aminoácido sulfurado homocisteína fue descrito por primera vez por Butz y du Vigneaud en 1932. La homocisteína no es un constituyente de la dieta y este no es incorporado en las proteínas, pero es exclusivamente formado como un producto intermediario del metabolismo de la metionina (Nygard, 1999).

Aunque la homocisteína existe en varias formas solamente el 1% se encuentra en la forma reducida (sulfidrilos) y la otra parte es oxidada y existe como varios disulfuros (Nygard, 1999), aproximadamente el 70% es unido a la albúmina y el 30% restante existe como disulfuros libres, en su mayor parte mezcla de disulfuros de homocisteína-cisteína, siendo después distribuida en sangre, en su forma libre y la unida a proteínas (Nygard, 1999).

La homocisteína se obtiene como resultado del metabolismo del aminoácido metionina. En este proceso la homocisteína se condensa con la serina de forma irreversible para formar cistationina, esta reacción es catalizada por la CBS y es también dependiente del piridoxal -5´ - fosfato (metabolito activo de la vitamina B₆) como un cofactor. La cistationina es hidrolizada a cisteína por la enzima cistationasa y es también una reacción dependiente de la vitamina B₆ (Fonseca, 1999; Eldibany, 2007).

Alternativamente la metionina puede ser reformada por la vía de remetilación cuando el grupo metilo es donado a la homocisteína. En esta vía el 5,10- metileno tetrahidrofolato es convertido a N-5-metil tetrahidrofolato (reacción 3a), en una reacción catalizada por la metileno tetrahidrofolato – reductasa (MTHFR), con la riboflavina como un cofactor (Fonseca, 1999; Eldibany, 2007).

El N-5-metil tetrahidrofolato dona un grupo metilo a la homocisteína en una reacción catalizada por la 5-metileno tetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa) y su cosustrato la

vitamina B₁₂ (Fonseca, 1999; eldibany 2007).

Por otro lado, el grupo metilo puede ser donado por la betaina en una reacción catalizada por la betaina-homocisteina metiltransferasa, formando dimetilglicina y metionina. La reacción de la betaina-homocisteina no es dependiente ni de la vitamina B₁₂ ni del folato (Fonseca, 1999; eldibany 2007).

2) β -Amiloide:

El nombre de proteína β -amiloide engloba a una familia de proteínas de entre 39 y 43 residuos que son secretadas de la membrana celular tras el procesamiento de una proteína de mayor tamaño, la proteína precursora amiloide (APP). La liberación de la proteína β -amiloide se produce por la acción secuencial de las β - y γ - secretasas sobre la proteína APP anclada a la membrana celular. Una tercera secretasa, la α -secretasa, es capaz de actuar sobre APP y dar lugar a dos fragmentos solubles (Sinha, 1999). Aunque aún no se ha descubierto cuál es la función fisiológica concreta de la proteína β -amiloide, se ha visto que se encuentra a concentraciones que oscilan entre 10 y 500 pM en el líquido cerebroespinal y en el torrente sanguíneo de personas sanas, no apreciándose diferencias significativas respecto a las concentraciones observadas en los enfermos de Alzheimer. Además, se sabe que las mutaciones que comportan tanto la sobreproducción de APP como el aumento de la actividad de alguna de las secretasas implicadas en el proceso de formación de β -amiloide pueden dar lugar al inicio prematuro o a casos agudos de la enfermedad de Alzheimer (Sinha, 1999; Dumery, 2001).

La forma más abundante de la proteína β -amiloide en el cerebro humano es la $\beta(1-40)$, aunque muchos autores postulan que es en realidad la forma $\beta(1-42)$ la desencadenante del proceso de formación de fibras amiloides *in vivo*, ya que esta especie presenta una mayor capacidad amiloidogénica (Jarret, 1993) y es capaz de actuar como centro de nucleación de la secuencia más corta. Algunos estudios *in vitro* apuntan a que únicamente las formas agregadas de β -amiloide son neurotóxicas (Hirakura, 1998; Zagorski, 1999), mientras que otros afirman que la capacidad neurotóxica de β -amiloide es independiente del estado de agregación en que se encuentre (Forloni, 1997; Tseng,

1999) y resultados aparecidos recientemente aseguran que las especies más citotóxicas son los oligómeros que se forman durante el proceso de agregación(Walsh, 2002; Stine, 2003).

Tanto la hormona de insulina como las proteínas β -amiloide son degradadas por la encima insulino-degradante (IDE). Según estudios recientes llevados a cabo por el Dr. Graff-Radford, 1999, tanto la hormona de insulina como las proteínas β -amiloide son degradadas por la encima insulino-degradante (IDE). El especialista agrega que si la sangre contiene exceso de insulina, como es el caso de los diabéticos, entonces IDE degrada preferencialmente la insulina en vez de amiloide. “Esto significa que habrían niveles más altos tanto de A β 42/A β 40 en la sangre de los diabéticos”, dice.

Test de Conducta:

El estudio de la función cognitiva en personas con diabetes empezó a ser de interés con Miles y Root, desde 1922, quienes reportaron que las personas con la enfermedad tenían un desempeño pobre en pruebas de memoria, aritmética y eficacia psicomotora, comparadas con personas sin la enfermedad. Desde ese entonces, diversas investigaciones se han realizado y existen estudios de análisis de comportamiento y electrofisiológicos que afirman que la DM puede inducir daño cognitivo y producir defecto en la potenciación de larga duración (LTP) en el hipocampo (Peters, 2004).

Al ser la diabetes tipo 2 un desorden metabólico asociado con alteraciones estructurales y funcionales de varios órganos en el individuo, la hiperglucemia crónica y la hipoglucemia recurrente severa, pueden tener efectos en la estructura y función del cerebro (Jacobson, 2002). La hiperglucemia característica principal de la DM 2 es probablemente el vínculo entre la diabetes y la vulnerabilidad del hipocampo mediado por una serie de trastornos metabólicos asociados con niveles de glucosa elevados (Trudeau, 2004).

Existe evidencia, desde hace tres décadas, de que la disfunción cognitiva está asociada a la DM (Strachan, 1997), sin embargo la importancia de estos hallazgos para el autocuidado

ha sido pobremente abordada (Sinclair, 200; Coker, 2003). Esto es relevante porque la memoria y el aprendizaje son habilidades cognitivas esenciales, primero, para la incorporación de contenidos, necesarios en la educación que se le proporciona al paciente con diabetes, y segundo, para la ejecución de prácticas de autocuidado saludables (Glanz, 2002).

Alteraciones morfológicas:

La DM provoca múltiples complicaciones morfológicas que afectan a diferentes órganos. Dichas complicaciones las podemos resumir de la siguiente forma:

- Vasos: Arterioesclerosis que afecta a aorta y arterias de mediano y gran calibre; Arteriolesclerosis hialina que afecta a las arteriolas. La pared vascular sufre un engrosamiento debido a la acumulación de depósitos de material hialino, produciendo un estrechamiento de la luz y una disminución generalizada del riego sanguíneo de los distintos órganos, que sufren atrofia progresiva; Microangiopatía diabética que afecta a los capilares. Se origina un engrosamiento de la membrana basal del capilar.

-Riñones: Engrosamiento de la membrana basal de los capilares; Esclerosis mesangial difusa. Se trata de un incremento difuso de la matriz mesangial, siempre asociado a engrosamiento de la membrana basal; Glomeruloesclerosis nodular de Kimmestiel-Wilson. Esta lesión está caracterizada por engrosamientos nodulares en el centro del mesangio; Hialinización glomerular. Esto lleva a una esclerosis glomerular y a una falta de irrigación de los túbulos por arteriolas eferentes, lo que define la atrofia tubular progresiva. Por lo que las nefronas van desapareciendo dando lugar a una esclerosis renal; Nefrosis glucogénica de Armani-Ebstein. Cúmulos de glucógeno en células tubulares; Lesiones exudativas: Capuchón de fibrina y gotas hialinas subcapsulares; Engrosamiento de las membranas basales tubulares; Arterioesclerosis hialina en

arteriolas; Microangiopatía diabética en capilares; Arterioesclerosis en las arterias de mediano y gran calibre; Papilitis necrosante. Las personas diabéticas son más propensas a sufrir infecciones de orina con necrosis y amputación de las puntas de las pirámides dando lugar a la llamada papilitis necrosante; Pielonefritis aguda o crónica. Inflamación de los riñones que suele iniciarse en el tejido intersticial con posterior extensión a los túbulos.

-Complicaciones oculares: Retinopatía. Esta lesión posee dos fases, en la primera fase, conocida como retinopatía no exudativa, se produce un exudado procedente de la mayor permeabilidad vascular, que puede ir acompañado de microhemorragias; en la segunda fase, o retinopatía proliferativa, se ocasiona una proliferación vascular y fibroblástica debido a los exudados formados en la primera fase, apareciendo cicatrices y cuyo final es una ceguera irreversible (Ortuño, 2005; Rozman, 1995 ; Kumar, 2008).

-Nervios: La complicación más frecuente en la diabetes es a nivel del sistema nervioso, estimándose que alrededor del 40% de los diabéticos presentan algún tipo de alteración neuropática en el momento del diagnóstico, viéndose afectados tanto nervios sensoriales como motores o autonómicos. Su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución de la enfermedad y con la edad del paciente. Esta afección lleva a un encharcamiento del tejido nervioso (debido al funcionamiento erróneo del sistema enzimático de la aldosa-reductasa), que a largo plazo provoca defectos en la transmisión del impulso nervioso. En muchos casos también se origina desmielinización de las fibras nerviosas, que se cree que es la causa principal de las neuralgias que sufre el diabético.

-Neuropatía diabética. Alteraciones nerviosas con pérdida de sensibilidad. Esto puede ser debido a: daño directo de las células de Schwann por mecanismos osmóticos o a microangiopatía de los pequeños vasos que son los encargados de nutrir los filetes nerviosos de mayor tamaño y que llevan a la desmielinización de los mismo (Ortuño, 2005).

La neuropatía diabética origina aumento de la respuesta vascular a NA (Moorhouse, 1966), y en la mayoría de los casos una disminución del flujo sanguíneo. La etiología de la disminución de flujo sanguíneo que se produce durante la diabetes y los mecanismos implicados en dicha reducción son aún muy desconocidos, y han comenzado a ser un importante objeto de estudio en la neuropatía diabética ya que se ha visto que las respuestas de vasos de los nervios, donde se ha demostrado histoquímicamente que hay terminaciones nerviosas adrenérgicas, serotoninérgicas y peptidérgicas, están disminuidas, lo que puede generar una alteración del flujo sanguíneo por inervación nerviosa, que pueden contribuir a la patogénesis de la neuropatía diabética (Kappelle, 1993; Kappelle, 1994).

- Páncreas: Infiltración leucocitaria de los islotes (Insulinitis), formada principalmente por Linfocitos T; Desgranulación, pérdida o disminución de las células Beta, debido al agotamiento de la insulina almacenada en las células que ya han sufrido lesiones; Fibrosis e hialinosis de islotes; Amiloidosis de islotes.

TRATAMIENTO:

Existen diversas formas de tratamientos para la diabetes, los cuales podríamos dividir en tratamiento farmacológico, como pueden ser las insulinas o antidiabéticos orales y tratamiento no farmacológico, como la dieta o el ejercicio físico.

Los objetivos terapéuticos deben de ser más estrictos en los pacientes más jóvenes, ya que tienen más posibilidad de desarrollar complicaciones (Vijas, 1997). También se observa un mayor beneficio cuando se pasa de un control glucémico deficiente a uno moderado, que cuando pasamos de un control moderado a uno cercano a la normoglucemia. Por último debemos recordar que la HbA1C es el mejor parámetro de control glucémico, ya que correlaciona con la aparición de complicaciones microvasculares y macrovasculares (Consejo Europeo, 1999; Asociación Americana de la Diabetes, 2004).

Tratamiento farmacológico:

En pacientes con DM tipo 1 el fármaco de elección es la insulina. También se requiere este tratamiento en pacientes embarazadas con diagnóstico de DMG y en caso de cetonuria intensa o glucemias ≥ 250 mg/dl. En el caso de la DM tipo 2, el tipo de tratamiento indicado para cada paciente depende de ciertos factores entre los que se incluyen la progresión de la enfermedad, la sensibilidad a la insulina, la aparición de hipoglucemia y si esta es fundamentalmente pospandrial, etc.

1) INSULINAS:

La insulina es una hormona peptídica constituida por dos cadenas, la A (21 aminoácidos) y la B (30 aminoácidos), unidas por un puente disulfuro. Es sintetizada por las células β de los islotes de Langerhans. Se une a receptores específicos presentes en tejidos sensibles a la insulina, como hígado, tejido adiposo y músculo, fundamentalmente. Esta unión afecta al metabolismo de glúcidos, pero también al de proteínas y lípidos, de la siguiente manera:

- **Glúcidos:** Disminuye la glucemia sanguínea, favoreciendo la captación de la glucosa y su utilización, bien por glucólisis o por estimulación de la glucogenosíntesis. Inhibe la gluconeogénesis hepática.

- **Lípidos:** Disminuye la movilización de lípidos por inhibición de la lipasa del adipocito. Favorece el transporte de los glúcidos y su acumulación en el tejido adiposo, al estimular a la lipoproteín-lipasa. Al aumentar los niveles de ácidos grasos y glicerol en el adipocito, estimula el depósito de triglicéridos. Inhibe además la β -oxidación.

- **Proteínas:** Favorece la captación de aminoácidos y la síntesis de proteínas. En la DM tipo 1 se produce ausencia de producción de insulina, lo que requiere un aporte exógeno de la misma. Actualmente, las insulinas de origen bovino o porcino han desaparecido prácticamente del mercado, siendo desplazadas por insulinas humanas obtenidas por ingeniería genética. Los preparados actuales comercializados son del tipo monocomponente, lo que quiere decir que la insulina se ha sometido a un proceso de ultrapurificación que elimina todo tipo de proteínas extrañas. La única diferencia entre insulinas digna de tenerse en cuenta es la duración de la acción. El uso de la insulina en DM tipo 2 no suele ser necesario de inicio, aunque sí puede utilizarse de forma limitada en pacientes que necesiten una estabilización inicial de la enfermedad (ej. Sintomatología importante o niveles de glucosa muy elevados).

Métodos para prolongar la acción de la insulina:

La insulina se destruye rápidamente (semivida plasmática inferior a 9 minutos) por lo que es necesario utilizar sistemas que prolonguen la acción. Para ello, se recurre a preparados inyectables por vía subcutánea que liberan lentamente la insulina desde el punto de inyección. Según el procedimiento utilizado, se obtienen diferentes tipos de insulina:

- Unión a otras proteínas: hoy en día se utiliza exclusivamente la protamina.

- **Cristalización controlada:** mediante adición de cinc y manipulando el pH del medio de cristalización, puede conseguirse que la insulina precipite controlando el tamaño de los cristales. Con estos precipitados se preparan suspensiones de insulina-cinc para inyección, que liberan la hormona tanto más lentamente cuanto mayor sea el tamaño de los cristales.

- **Desarrollo de análogos de acción lenta:** mediante técnicas de sustitución de determinados aminoácidos (insulina glargina) o unión de la insulina a un ácido graso como el ácido mirístico (insulina detemir), se han conseguido análogos de insulina basal de acción lenta que proporcionan un inicio de acción más lento aunque con mayor duración de acción.

Métodos para acelerar la acción de la insulina:

La insulina lispro y la insulina glulisina son modificaciones biosintéticas de la insulina natural que consiste en intercambiar los aminoácidos en posición 28 y 29, en el primer caso, de la cadena B (lisina y prolina), y 3 y 29 en el segundo caso (lisina y ácido glutámico). La insulina así modificada tiene menos tendencia que la natural a formar hexámeros en solución. Como los hexámeros tienen que disociarse antes de que la insulina sea absorbida del punto de inyección, el resultado práctico es que estas insulinas tienen un comienzo más rápido y duración de acción más corta que la insulina soluble normal. Esto tiene interés dentro de los esquemas actuales de control estricto de glucemia. Los preparados obtenidos por estos procedimientos se suelen clasificar de acuerdo con la duración de la acción en rápidas, intermedias y lentas. Es importante recordar que todas las insulinas retardadas (en suspensión translúcida) se aplican por vía subcutánea. Solo la insulina no retardada (en solución transparente) puede inyectarse por vía intravenosa.

Mezclas de insulinas:

Existen en el mercado mezclas preparadas de insulina rápida con intermedia, con el propósito de obtener un medicamento de comienzo rápido y larga duración. Estos preparados, llamados insulinas bifásicas, se adaptan bien por otra parte a los criterios modernos de dosificación de insulinas. Las insulinas-cinc se prestan peor a estas combinaciones porque el cinc residual tiende a retrasar la acción de la insulina normal.

2) ANTIDIABÉTICOS ORALES:

Los antidiabéticos orales presentan mecanismos de acción diferentes que inciden sobre diversos factores causantes de la hiperglucemia en la DM tipo 2. El tratamiento de los pacientes con DM tipo 2 depende de varios factores que influyen sobre el fármaco a usar: progresión de la enfermedad, sensibilidad a la insulina, presencia de hipoglucemias, hiperglucemia fundamentalmente posprandial, etc.

Criterios de utilización de antidiabéticos orales:

Aunque los criterios de utilización de antidiabéticos orales no son uniformes, en general se emplea un criterio escalonado, como el siguiente:

- Pacientes con diabetes tipo 2 en los que es insuficiente el control de la dieta y el ejercicio y presentan normopeso o ligero sobrepeso. Se inicia el tratamiento con sulfonilureas. Se comienza con dosis bajas, aumentándolas gradualmente con controles semanales hasta conseguir niveles óptimos. Actualmente puede recurrirse a las metiglitinidas o iniciarse monoterapia con glitazonas.
- Pacientes con diabetes tipo 2 en los que es insuficiente el control de la dieta y ejercicio y presentan sobrepeso. Son candidatos al tratamiento con metformina.
- Pacientes en los que la monoterapia es insuficiente. Puede ensayarse el tratamiento combinado antes de iniciar la insulino terapia, utilizando fármacos con mecanismos hipoglucemiantes

complementarios. Pueden ensayarse varias combinaciones, si no se consigue un control adecuado.

- Inhibidor de dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4) asociado a metformina, tiazolidindionas o sulfonilureas: facilitan el control glucémico en aquellos pacientes mal controlados con antidiabéticos orales convencionales. Tienen un riesgo bajo de hipoglucemia y escasa incidencia sobre el peso de los pacientes.

- Sulfonilurea + Metformina. Con mecanismos de acción sinérgicos. Más del 50% de los pacientes no controlados con dosis altas de sulfonilurea mejoran con la adición de metformina. La terapia combinada debe administrarse durante unos 6 meses. Si no se consiguen los objetivos deseados, se debe añadir o sustituir por insulina.

- Sulfonilurea + Tiazolidindionas. Los estudios realizados demuestran una eficacia similar a la asociación anterior.

- Repaglinida + Metformina. La adición de repaglinida al tratamiento con metformina es altamente eficaz en sujetos no controlados mediante metformina sola.

- Antidiabético oral + Insulina (o exenatida). Pacientes con requerimientos no elevados de insulina se pueden beneficiar de este tratamiento. La exenatida facilita la reducción de peso de los pacientes, mientras que las insulinas tienden a incrementarlo. Esto debe ser considerado en pacientes obesos o con claras tendencias al sobrepeso. Entre las combinaciones más utilizadas:

- Insulina (exenatida) + Sulfonilurea: para que sea eficaz es imprescindible una secreción endógena de insulina. Se consigue una reducción de las dosis de insulina y de los niveles de insulina circulante. En general, con la terapia combinada se puede conseguir un mejor control que con insulina sola, pero no es tan bueno como intensificar el tratamiento de insulina.

- Insulina (exenatida) + Metformina: algunos estudios sugieren que esta asociación puede ser eficaz en pacientes mal controlados con insulina sola, después de un fracaso con sulfonilureas. Además

la metformina no agrava la hiperinsulinemia.

- Insulina + Metiglinida: actualmente se dispone de estudios en los que se ha comprobado la eficacia de la combinación de una metiglinida con la inyección nocturna de insulina.

- Pacientes con glucemias posprandiales elevadas. Los inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-4, los de las α -glucosidasas y las metiglinidas son consideradas especialmente indicadas en este tipo de pacientes, atendiendo a su mecanismo de acción. (Consejo general de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 1999).

Tratamiento no farmacológico:

En la DM el tratamiento no farmacológico va a tener tanta importancia como el tratamiento farmacológico, si no más. La dieta y el ejercicio de forma conjunta constituyen el tratamiento inicial de la enfermedad en pacientes con DM tipo 2, siendo suficiente en etapas iniciales, aunque según progresa se necesitará de tratamiento farmacológico. En DM tipo 1 el uso de insulina será inevitable, pero la dieta y el ejercicio seguirán siendo partes centrales del manejo de la enfermedad.

Los cambios en el estilo de vida o la capacidad de autocontrolar la enfermedad requerirán de una educación sanitaria adecuada. (Sociedad de Diabetes).

MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles (Von Hoosier, 1999; Zuñiga, 2001).

El uso de los animales de laboratorio en las investigaciones biomédicas representa un elemento fundamental en el desarrollo de importantes avances en la prevención y tratamiento de las enfermedades transmisibles y no transmisibles

Clásicamente, los modelos in vivo empleados en investigación se han dividido en cuatro grupos, a partir del estudio de patologías humanas:

1. Espontáneos:

En ellos la variable a investigar aparece de forma natural, a partir de la variabilidad genética expresada en una determinada línea animal. Habitualmente, se obtienen por selección de entre los animales consanguíneos o genéticamente uniformes que expresan esa variable o de entre poblaciones en que un gran número de individuos expresan la variable en cuestión. Se han analizado y categorizado cientos de cepas/estirpes de animales que padecen enfermedades espontáneas que también aparecen en el hombre. Se ha establecido una lista de más de 200 enfermedades en animales atribuidas a errores innatos del metabolismo y que no han sido inducidas de forma experimental. Por ejemplo, ratón desnudo (nude, hairless) que es un modelo mutante natural, empleado en estudios inmunológicos, oncológicos y de enfermedades infecciosas, debido a que no presentan timo y por lo tanto carecen de linfocitos

T o timocitos. Diabetes, arteriosclerosis e hiper colesterolemia, obesidad u osteoporosis, son otras de las patologías para las que, actualmente, existen buenos modelos animales espontáneos.

Ejemplos de modelos espontáneos:

- Ratas Wistar Kyoto o Hipertensas Espontáneas (SHR), que genéticamente presentan una elevada y sostenida hipertensión arterial (Zuñiga, 2001).
- La rata Zucker (*fa/fa*): También llamada ZDF (*Zucker Diabetic Fatty Rat*) aludiendo a su característico fenotipo obeso. La mutación “fatty” (*fa*) fue publicada por Zucker and Zucker en 1961. Los animales homocigotos para el alelo *fa* (receptor de la leptina no funcionando) son apreciablemente obesos ya a las 3 a 5 semanas de vida. Para la semana 14, su composición corporal consta de más de un 40% de lípidos. La obesidad se hereda de modo recesivo y los animales afectados son hiperlipidémicos, hipercolesterolémicos e hiperinsulinémicos, y desarrollan hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, semejando la obesidad humana, por ello la rata Zucker es el mejor conocido y más ampliamente usado modelo genético de obesidad humana de comienzo precoz. La rata ZDF presenta tanto resistencia a la insulina (como resultado del receptor mutado de leptina, que causa obesidad), como inadecuada compensación por parte de la célula β . Esto último parece depender de un defecto transcripcional en la célula β , que se hereda independientemente de la mutación del receptor de la leptina y la resistencia a la insulina (Griffen, 2001). Las ratas con genotipos homocigoto dominante (+/+) y heterocigoto (*fa*/+) no presentan obesidad ni hiperglicemia. La rata Zucker no ha sido utilizada tan extensamente como modelo de DM 2, probablemente porque, a diferencia de los ratones *db/db* y *ob/ob*, su hiperglicemia es discreta (Muller, 1988), existiendo variaciones entre colonias. Sin embargo, presenta algunas complicaciones similares a la DM 2 humana (Lash, 1989), así como hiperinsulinemia secundaria a resistencia periférica a la insulina, la cual es especialmente marcada en el músculo e hígado (Terrettaz, 1986).

- *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena): En su hábitat natural, el *Psammomys obesus* sigue una dieta esencialmente vegetariana, sin embargo, cuando se alimenta con dieta estándar de rata de laboratorio, se hace obeso, resistente a la insulina e hiperglicémico (Ziv, 1999). Si además se usa una dieta rica en colesterol, los animales desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis (Marquie, 1991). Al igual que en la DM 2 humana, el estado hiperglicémico se asocia con un aumento de los niveles de proinsulina y productos de fragmentación, presumiblemente debido a la elevada demanda de secreción insulínica por la resistencia periférica a dicha hormona. También se ha encontrado alteración en la biosíntesis de insulina en los islotes de Langerhans (Cerasi, 1997).

- La rata OLETF (*Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat*): En 1984, dentro de una colonia de ratas Long-Evans (Charles River, Canada), se descubrió una rata con diabetes espontánea, poliuria, polidipsia y discreta obesidad. Desde entonces, se mantiene una línea de ratas procedentes de aquella en la compañía farmacéutica Otsuka y se las denomina por ello OLETF (Kawano, 1992). Sus características incluyen: a) un desarrollo tardío de la hiperglicemia (tras 18 semanas de edad); b) un curso crónico de la enfermedad; c) discreta obesidad; d) aparición clínica de diabetes principalmente en los machos; e) participación de múltiples genes diabetogénicos recesivos, la transmisión de uno de los cuales (denominado odb-1) se encuentra ligada al cromosoma X, y f) nefropatía diabética, en forma de glomeruloesclerosis difusa y lesiones nodulares. Además, existen alteraciones en los islotes pancreáticos que pueden ser clasificadas en tres estadios: a) precoz (menos de 9 semanas de edad), con discreta infiltración linfocitaria; b) hiperplásico (10-40 semanas de edad), con incremento del número de células y fibrosis dentro o alrededor de los islotes, y c) final (más de 40 semanas de edad), con atrofia de los islotes. Las citadas manifestaciones clínicopatológicas de las ratas OLETF se asemejan bastante a las de la DM 2 humana. Es de destacar que las ratas OLETF son portadoras de un alelo nulo para el gen de la colecistoquinina A (CCK-A), lo cual conlleva una capacidad reducida para procesar las señales gastrointestinales de saciedad tras la ingesta de

nutrientes. Esto puede ser la causa de un aumento de la cantidad de alimento en cada ingesta, con hiperfagia y obesidad (Schwartz, 1999). Además, los análisis de patrones de expresión génica hipotalámica indican la presencia de un déficit primario en la señalización del neuropéptido Y en el hipotálamo dorsomedial. Así pues, la obesidad en la rata OLETF puede ser debida al mal funcionamiento de dos vías de regulación, una periférica, como es la saciedad tras la ingesta, y otra relacionada con mecanismos centrales críticos para el mantenimiento del balance energético global (Bi, 2002). La DM 2 de las ratas OLETF puede ser prevenida eficazmente mediante el ejercicio cuyo efecto protector perdura al menos 3 meses tras el cese del mismo (Shima, 1996). También la administración de insulina logra evitar tanto la disfunción de las células β como los cambios morfológicos en el páncreas (Ishida, 1995).

- El ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO): Se trata de una cepa endogámica de ratones originaria de Nueva Zelanda y seleccionada por obesidad poligénica (Bielschowsky, 1953). Los ratones NZO de ambos sexos presentan elevado peso desde su nacimiento y aumento de su grasa corporal, que refleja predominantemente hipertrofia de los adipocitos más que hiperplasia de los mismos. El desarrollo de diabetes en este modelo representa un complejo fenómeno tipo umbral en el que la tasa de adiposidad precoz establece un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina (Reifsnyder, 2000). Los ratones NZO machos desarrollan hipertensión cuando se les somete a una dieta con elevado contenido graso. A las 8 semanas de vida, a pesar de la obesidad, los ratones permanecen normoglicémicos y con niveles plasmáticos de insulina y leptina no demasiado elevados. La hiperglicemia es de aparición tardía (alrededor de la semana 16) y evolución crónica una vez establecida. Como anomalías metabólicas precoces se han documentado tanto resistencia a la insulina como excesiva producción de glucosa por parte del hígado (Veronic, 1991).

- *Psammomys obesus* (rata israelí de la arena): En su hábitat natural, el *Psammomys obesus* sigue una dieta esencialmente vegetariana, sin embargo, cuando se alimenta con dieta estándar

de rata de laboratorio, se hace obeso, resistente a la insulina e hiperglicémico (Ziv, 1999). Si además se usa una dieta rica en colesterol, los animales desarrollan hiperlipidemia y aterosclerosis (Marquie, 1991). Al igual que en la DM 2 humana, el estado hiperglicémico se asocia con un aumento de los niveles de proinsulina y productos de fragmentación, presumiblemente debido a la elevada demanda de secreción insulínica por la resistencia periférica a dicha hormona. También se ha encontrado alteración en la biosíntesis de insulina en los islotes de Langerhans (Cerasi, 1997).

- El ratón *ob/ob*: A diferencia de los mutantes *db/db*, los ratones *ob/ob* son portadores de una mutación en el gen de la propia leptina (Chua, 1996). Representa un buen modelo para el estudio de la obesidad, siendo la incidencia de diabetes en estos ratones relativamente baja. Esta cepa tiene además una esperanza de vida más larga y sintomatología menos acentuada que la del mutante *db/db*.

- El ratón *db/db*: El “gen de la diabetes” (*db*) se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria (Chen, 1996). La mutación *db/db* muestra muchas de las características de la DM 2 humana (Sharma, 2003). Los ratones *db/db* son insensibles al suministro de leptina exógena (Campfield, 1996). La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días, acusando ya discreta elevación de la glucemia alrededor del mes y siendo franca la hiperglicemia a las 8 semanas de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células β de los islotes (Like, 1972), entrando en la fase hipoinsulinémica.

2. Inducidos:

Las variables a investigar son provocadas experimentalmente. Según el método utilizado para su inducción se pueden clasificar en cinco grandes grupos:

1) Por administración de sustancias biológicamente activas:

Otros modelos están basados en la administración de determinadas sustancias con efectos tóxicos sobre las células β del páncreas.

El uso de agentes químicos para producir la diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético.

Los agentes químicos que más se emplean en investigación son el aloxano y la estreptozotocina (STZ). Estos compuestos en dosis diabéticas actúan específicamente sobre las células beta del páncreas (Mora, 2009; Ning, 2011).

ESTREPTOZOTOCINA:

La estreptozotocina (STZ), es un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer, induce DM 2 en roedores recién nacidos no predispuestos, mediante la destrucción de las células β pancreáticas.

La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro. Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa (Wang, 1998), y la función de la glucocinasa (Zahner, 1990), e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA (Bolzan, 2002). En este sentido, la STZ actúa como un elemento esencial ya que su molécula consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, y como tal es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento

de nitrosoarea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células β pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa (tienen que monitorizar continuamente sus niveles plasmáticos), también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ.

La sensibilidad a la STZ varía según la especie animal, la cepa, el sexo, la edad y el estado nutricional. El modo y ruta de su administración resultan determinantes para su efecto. Una única dosis importante de estreptozotocina puede inducir diabetes en roedores, probablemente debido a efecto tóxico directo. De modo alternativo, se puede usar en forma de múltiples dosis pequeñas (p. ej., 40 mg/kg en 5 días consecutivos). Administrada de este modo, induce una diabetes insulínopénica en la que interviene la el sistema inmune, tal como ocurre en la diabetes DM 1 humana. El modelo de baja dosis múltiple de estreptozotocina ha sido ampliamente utilizado para estudiar los acontecimientos inmunológicos que conducen a la insulinitis y muerte celular β (Holstad, 2001; Mensah-Brown 2002, Muller, 2002; Yang, 2003), sin embargo, sigue produciendo diabetes incluso en ausencia de células T y B funcionantes (Portha, 1989), lo que sugiere que, aún a estas dosis, permanece cierto grado de toxicidad sobre las células β , predisponiéndolas al fracaso en presencia de algún tipo de sobrecarga o simplemente con el tiempo. De este modo, se ha utilizado el modelo de administración de STZ como modo de producir un modelo de DM 2 en los roedores ya adultos (Portha, 1989; García, 1994).

ALOXANO:

Aunque desde hace muchos años se conoce la actividad diabetogénica de esta sustancia, el mecanismo de acción es aún desconocido. Algunas evidencias indican que el efecto de la aloxano es mediado por una interacción a nivel de membrana en la célula β (Bailey, 1946). Otros estudios en los que se ha utilizado aloxano marcada con ^{14}C revelan que hay una alta afinidad de la sustancia por la membrana celular, lo que ocasiona alteraciones en su permeabilidad, lo cual puede explicar, en parte, la necrosis selectiva observada en las células β del islote pancreático (Goldner, 1947).

La principal ventaja de los modelos basados en administración de fármacos es que el grado de alteración de las células β puede ser regulado de acuerdo con la dosis de toxina administrada. Su gran desventaja reside en que rara vez la diabetes humana es causada por un tóxico de este tipo.

La administración de corticoides en diversos períodos de la vida del animal puede causar un estado similar a la DM 2 humana, este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM 2 que aparece en humanos trasplantados o en tratamiento esteroideo crónico. Otras hormonas que pueden causar hiperglicemia en animales son la somatostatina, el glucagon, las catecolaminas y la tiroxina.

2) Por manipulación quirúrgica:

Modelos tradicionales de ligadura pilórica. Otros ejemplos son los de ligadura o implantación de clips de la arteria renal para la simulación de estados de hipoxia e insuficiencia de este órgano, o la hepatectomía parcial para el estudio de la regeneración hepática.

3) Por inducción basada en dietas modificadas:

Las dietas carenciales en algún elemento o suplementadas con exceso de alguno de sus componentes naturales son la base para el estudio clásico de enfermedades provocadas por hiperlipemias, esclerosis vasculares, hipovitaminosis, o el desarrollo de modelos de cancerogénesis.

4) Por inducción debida a cambios etológicos:

Las modificaciones de factores sociales o del entorno pueden provocar cambios en el comportamiento, que constituyen valiosos modelos. Es el caso de inducción de ratones “giradores” o que manifiestan otros movimientos estereotípicos, de ratas “asesinas” por aislamiento, modelos de aprendizaje para estudio de psicofármacos.

5) Por transgenización o mutagenénesis dirigida:

Por medio de microinyección de ADN en el pronúcleo de oocitos, la infección de embriones con vectores retrovirales o el empleo

de sustancia mutagénicas de amplio espectro. Mediante estas técnicas se están obteniendo gran número de modelos especiales, de gran ayuda en la comprensión de los mecanismos de acción tanto patológicos como terapéuticos (Zúñiga, 2008).

3. Negativos:

En ellos una determinada variable o fenómeno biológico no se desarrolla o no se expresa. Por ejemplo, algunas razas de conejos son resistentes a la infección por gonococos. Este modelo animal también es aplicable a aquellos animales que no muestran sensibilidad a determinados estímulos que, normalmente, sí tienen efecto sobre otras especies. Se utilizan para el estudio de los mecanismos que proporcionan resistencia a patologías concretas que se encuentran asociados a una ausencia de sensibilidad.

4. Huérfanos:

En ellos se expresa una determinada variable hasta ahora no conocida o expresada en la especie humana. Cuando dicha variable es descrita también en la especie humana, se dice que estos modelos animales se han “adoptado” y entonces pasarán a incluirse en una de las categorías anteriores. Por ejemplo, la enfermedad de las “vacas locas” o encefalitis espongiforme bovina, si bien se ha encontrado su correlación con la enfermedad de Kreutz-Jacobson, con lo cual este modelo es candidato a ser “adoptado”.

Para la realización de este estudio hemos utilizado el modelo espontáneo de ratón db/db ya que a partir de las cuatro semanas de vida los animales presentan hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperfagia y obesidad por lo que representan un buen modelo para estudiar la diabetes.

POLIFENOLES

Los compuestos polifenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con una lista de más de 8000 estructuras que sigue en continuo crecimiento. Existen numerosas clasificaciones, pero normalmente se agrupan según el número de anillos fenólicos que contienen y en función de cómo se unen entre sí. Se distinguen dos grandes grupos de moléculas, polifenoles flavonoides y no flavonoides, siendo el primero el más numeroso (Figura 10). Los polifenoles también se pueden clasificar en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática que se encuentra sustituyendo el núcleo bencénico. Sus estructuras van desde moléculas muy simples, como los ácidos fenólicos, hasta otras altamente polimerizadas, como los taninos. Suelen encontrarse en la naturaleza unidos a un resto de azúcar, que principalmente es la glucosa.

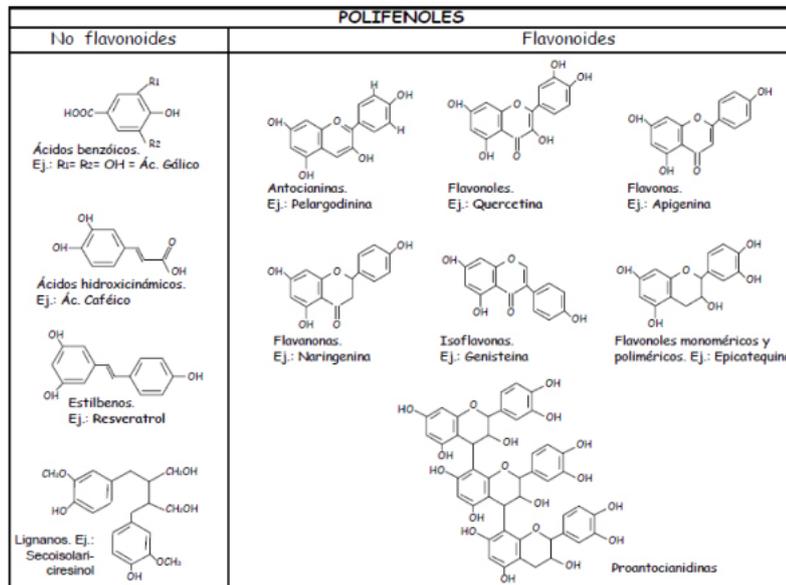


Figura 10. Clasificación de los polifenoles

Desde hace décadas, los polifenoles presentes en las plantas han interesado a los científicos. Estos compuestos son esenciales tanto en la fisiología como en la morfología de los vegetales. La función de los polifenoles en los vegetales es variada: pueden

actuar como antioxidantes, pueden inhibir o activar el crecimiento de las plantas, inhibir la degradación de la auxina (hormona vegetal), también captan el 90% de las radiaciones UV impidiendo los efectos nocivos de las radiaciones en los tejidos internos, resistencia a plagas o a condiciones ambientales adversas. Son componentes de esencias y pigmentos de las flores que confieren aromas y coloraciones atrayentes de insectos con lo que se favorece el proceso de floración, en las plantas polinizadas por insectos, del mismo modo los fenoles también confieren aromas y colores a los frutos que los hacen apetecibles para los herbívoros. A nivel de microorganismos, las plantas se defienden del ataque de patógenos sintetizando fitoalexinas, que son tóxicos para los microorganismos atacantes. También los fenoles protegen a las plantas generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables para los herbívoros, por lo que este tipo de animales se nutren de otras plantas. En general la acción principal de estos compuestos es la de establecer relaciones químicas de las plantas con su entorno. Se encuentran prácticamente en todas las plantas y por tanto se encuentran integrados en la dieta humana (Cheynier, 2005).

Una vez incorporados a la dieta humana, los polifenoles pueden tener variados efectos. Como antioxidantes, se les ha atribuido una gran cantidad de propiedades beneficiosas para la salud, ya que pueden proteger estructuras celulares del ataque de especies reactivas del oxígeno y así limitar el riesgo de padecer enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Existen numerosos estudios que atribuyen a los polifenoles de la dieta un importante papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, *Diabetes Mellitus* y enfermedades neurodegenerativas (Scalbert, 2005). Sin embargo, en los últimos años se han publicado nuevos estudios que sugieren una gran variedad de mecanismos de acción diferentes a la acción antioxidante, a través de los cuales los polifenoles podrían ejercer parte de sus acciones beneficiosas sobre los sistemas biológicos. Entre estos otros mecanismos destacan su capacidad para modular la actividad de enzimas tales como la telomerasa (Naasani, 2003), la ciclooxigenasa (O'Leary, 2004; Hussain, 2005) y la lipooxigenasa (Schewe, 2001; Sadik, 2003),

o su capacidad para interactuar con señales de transducción y receptores celulares (Birt, 2001; Wiseman, 2001; Kris-Eterno, 2002). También se han descrito sus efectos en el tratamiento de la infección por VIH (Artico, 1998), y se han puesto de manifiesto sus efectos antiinflamatorios (Rahman, 2006; Biesalski, 2007), antiaterogénicos, antidiabéticos (Manach, 2005), y antiobesidad (Hsu, 2008).

FLAVONOIDES

Clásicamente, la medicina tradicional ha utilizado extractos de plantas en el tratamiento de numerosas enfermedades, desde las enfermedades inflamatorias al cáncer. Por otra parte, numerosos estudios indican la importancia de la ingesta de dietas ricas en productos vegetales en la prevención de múltiples patologías, entre las cuales están, el cáncer (García-Closas, 1999; Hillman, 2001; Gates, 2009), la diabetes tipo 2 (Scalbert, 2005), las enfermedades cardiovasculares (Berkow, 2007; Benavente-García, 2008; Grassi, 2009), las enfermedades neurodegenerativas (Scalbert, 2005; Letenneur, 2007), enfermedades inflamatorias crónicas y alergias (Kim, 2004a; Rahman, 2006). Por todo ello, en los últimos tiempos, se han llevado a cabo numerosos estudios para descubrir las moléculas responsables de las propiedades saludables de los vegetales.

Se han identificado numerosos compuestos, como los micronutrientes, la fibra o el licopeno (Berkow, 2007; Patel, 2007); sin embargo, podemos destacar de entre todos ellos el grupo de los flavonoides (Chun, 2005). Los flavonoides se consideran fitoquímicos, al contrario que las vitaminas y otros micronutrientes, ya que no son esenciales para el bienestar a corto plazo, y son metabolizados en el organismo como si fueran xenobióticos (Crozier, 2009).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que constan de 15 C, su estructura básica es una benzo-y-pirona (dos anillos aromáticos unidos por un puente de 3 C, es decir, C6-C3-C6) (Figura 11) (Benavente-García, 2008; Crozier, 2009).

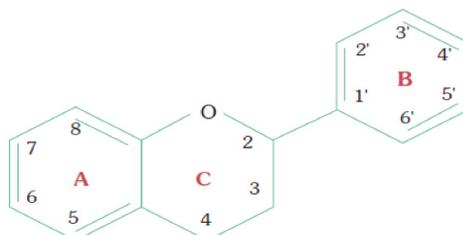


Figura 11. Estructura básica de los flavonoides

Dentro de los compuestos fenólicos son los más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal. Están presentes fundamentalmente en la epidermis de las hojas y la piel de la fruta.

Según la conexión entre los anillos B y C, el estado de oxidación y los grupos funcionales del anillo C se pueden clasificar principalmente en: flavonoles, flavonas, flavan-3-ol, antocianidinas, flavanonas, isoflavanonas (Crozier, 2009).

Actualmente existen más de 8000 flavonoides vegetales descritos, esto es debido a que muchos flavonoides se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos.

Los compuestos fenólicos protegen de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñando un papel clave en la prevención de la aterosclerosis. También pueden prevenir la trombosis, inhibiendo la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar. Este efecto se ha demostrado mediante experimentos con animales e *in vitro*. En muchos casos se inhibe la AMP cíclico fosfodiesterasa y como resultado se incrementan los niveles de cAMP. Asimismo, se reduce el nivel de calcio, se inhibe el “factor de activación plaquetario”, se promueve la captación de los radicales libres y se reduce la liberación de enzimas que favorecen la agregación plaquetaria.

Los compuestos fenólicos también son considerados como reguladores del sistema inmune y como antiinflamatorios, probablemente debido a la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, reduciendo los niveles de tromboxano. También modulan la actividad enzimática de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, fosfolipasa A2, hialuronidasa, e inhiben la acción de la angiotensina convertasa, mieloperoxidasa (que produce el hipoclorito y otros prooxidantes) y xantinooxidasa (que produce los radicales superóxido), entre otras. Dichos efectos les otorgan un amplio potencial para su utilización con fines médicos (Craig, 1996). Son numerosos los estudios que han mostrado que este tipo de compuestos poseen propiedades antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica y captando radicales libres como hidroxilo, supéroxido y radicales alocoxido (Schiel, 1991).

Igualmente se han descrito efectos antivíricos, antibacterianos y antifúngicos. Se ha observado *in vitro* el potencial de la epicatequina como agente antivírico y las antocianidinas pueden inhibir las enzimas que intervienen en la replicación del rinovirus y del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Hocman, 1989).

Los efectos beneficiosos de la ingesta de un elevado número de alimentos ricos en compuestos fenólicos como cerveza, fresas, espinacas, vino tinto, etc. se pueden evaluar a corto plazo ya que aumentan la capacidad antioxidante en suero (Cao, 1998; Velioglu, 1998; Kähkönen, 1999), lo que avala el creciente interés por el consumo de alimentos ricos en estos compuestos (Hertog, 1995).

Desde el punto de vista bioquímico, los compuestos fenólicos también tienen un especial interés debido a su potencial anticarcinógeno, bien estimulando el bombeo de ciertos agentes cancerígenos hacia el exterior de las células o bien mediante la inducción de enzimas de detoxificación (Mazza, 2000). En la bibliografía científica son múltiples las referencias que demuestran que los flavonoides tienen efectos citostáticos en varios sistemas *in vitro* y que son capaces de regular ciertos procesos importantes en el desarrollo del cáncer. Los flavonoides tienen actividad antipromotora, efecto antiinvasivo, e inhiben enzimas como la tirosina proteinkinasa, la ornitina decarboxilasa ATP dependiente y la DNA topoisomerasa. Numerosos trabajos de investigación demuestran que los isoflavonoides de la soja, especialmente la genisteína, pueden tener efecto protector frente a diferentes tipos de cáncer (mama, colon y piel). Este hecho, se ha relacionado con el efecto estrogénico de los isoflavonoides, mediante diferentes mecanismos bioquímicos (Barnes, 1995).

Flavonoides y su consumo en la alimentación:

En la dieta, las principales fuentes de flavonoides son las frutas y verduras (manzanas, uvas, cebollas, legumbres), el cacao manufacturado como el chocolate negro y las bebidas como el café,

el té (negro o verde) y el vino tinto (Aherne, 2002; Beecher, 2003; Manach, 2004; Somerset, 2008; Crozier, 2009).

La ingesta de flavonoides en la dieta puede ser muy variada según el país, así como en Japón la fuente fundamental de flavonoides es el té, en Finlandia son las frutas y verduras (Aherne, 2002), en EEUU y Australia los cítricos y el té (Johannot, 2006; Chun, 2007), etc.

Estudios realizados por diferentes países proponen el consumo medio de flavonoides en la dieta. Así como en EEUU el consumo es de 190 mg/día aproximadamente (Chun, 2007); en Finlandia y Japón los valores son más bajos, $24,2 \pm 26,7$ mg/día (Knekt, 2002) y 63 mg/día (Arai, 2000) y en Australia los valores llegan hasta 454 mg/día (Johannot, 2006). Estas variaciones tan visibles en los resultados pueden ser debidas a la diferente metodología de los trabajos, ya que según el número de flavonoides estudiados obtendremos un resultado u otro.

Flavonoides y sus efectos saludables:

Existen numerosos estudios realizados acerca de los flavonoides y su efectividad sobre distintas enfermedades crónicas; especialmente, el consumo de flavonoles, ha demostrado reducir el riesgo de mortalidad y morbilidad por este tipo de patologías. (Grassi, 2009). Diversos estudios han demostrado que un consumo elevado de flavonoles y flavonas previenen la muerte por enfermedades coronarias o el infarto de miocardio no fatal (Knekt, 1996; Hirvonen, 2001).

Los compuestos fenólicos protegen de la oxidación a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) desempeñando un papel clave en la prevención de la aterosclerosis.

También pueden prevenir la trombosis, inhibiendo la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar. Este efecto se ha demostrado mediante experimentos con animales *in vitro* e *in vivo*.

En muchos casos se inhibe la AMP cíclico fosfodiesterasa y como resultado se incrementan los niveles de cAMP. Asimismo, se reduce el nivel de calcio, se inhibe el “factor de activación plaquetario”, se promueve la captación de los radicales libres y se reduce la liberación de enzimas que favorecen la agregación plaquetaria.

Los compuestos fenólicos también son considerados como reguladores del sistema inmune y como antiinflamatorios, probablemente debido a la modulación del metabolismo del ácido araquidónico, reduciendo los niveles de tromboxano. También modulan la actividad enzimática de la ciclooxigenasa, lipoxigenasa, fosfolipasa A2, hialuronidasa, e inhiben la acción de la angiotensina convertasa, mieloperoxidasa (que produce el hipoclorito y otros prooxidantes) y xantinaoxidasa (que produce los radicales superóxido), entre otras. Dichos efectos les otorgan un amplio potencial para su utilización con fines médicos (Craig, 1996). Son numerosos los estudios que han mostrado que este tipo de compuestos poseen propiedades antioxidantes, inhibiendo la peroxidación lipídica y captando radicales libres como hidroxilo, superóxido y alcoxi radical (Schiel, 1991)

Igualmente se han descrito efectos antivíricos, antibacterianos y antifúngicos. Se ha observado *in vitro* el potencial de la epicatequina como agente antivírico y las antocianidinas pueden inhibir las enzimas que intervienen en la replicación del rinovirus y del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Hocman, 1989).

Los efectos beneficiosos de la ingesta de un elevado número de alimentos ricos en compuestos fenólicos como cerveza, fresas, espinacas, vino tinto, etc. se pueden evaluar a corto plazo ya que aumentan la capacidad antioxidante en suero (Cao, 1998; Velioglu, 1998; Kähkönen, 1999), lo que avala el creciente interés por el consumo de alimentos ricos en estos compuestos (Hertog, 1995).

Desde un punto de vista bioquímico, los compuestos fenólicos también tienen un especial interés debido a su potencial anticarcinógeno, bien estimulando el bombeo de ciertos agentes cancerígenos hacia el exterior de las células o bien mediante la inducción de enzimas de detoxificación (Mazza, 2000). En la

bibliografía científica son múltiples las referencias que demuestran que los flavonoides tienen efectos citostáticos en varios sistemas *in vitro* y que son capaces de regular ciertos procesos importantes en el desarrollo del cáncer. Los flavonoides tienen actividad antipromotora, efecto antiinvasivo, e inhiben enzimas como la tirosina proteinkinasa, la ornitina decarboxilasa ATP dependiente y la DNA topoisomerasa. Numerosos trabajos de investigación demuestran que los isoflavonoides de la soja, especialmente la genisteína, pueden tener efecto protector frente a diferentes tipos de cáncer (mama, colon y piel). Este hecho, se ha relacionado con el efecto estrogénico de los isoflavonoides, mediante diferentes mecanismos bioquímicos (Barnes, 1995).

Flavonoides y diabetes:

Hay una gran evidencia epidemiológica de que las dietas ricas en frutas y verduras puede reducir la incidencia de las enfermedades no transmisibles como la diabetes. Estos efectos protectores se atribuye, en parte, a los metabolitos fenólicos secundarios (Crozier, 2009).

Se ha postulado que la suplementación con compuestos antioxidantes dietéticos, tales como ácido ascórbico y vitamina E puede ofrecer algo de protección contra las complicaciones que provoca la diabetes (retinopatía, nefropatía y enfermedad coronaria) a través de su papel como inhibidores de la glicosilación y como captadores de radicales libres (Davie, 1992; Sinclair, 1992). Comenzaron a existir intereses en la utilización de sustancias antioxidantes que no fuesen vitaminas tales como flavonoides y polifenoles en la reducción del efecto negativo del estrés oxidativo y los radicales libres en pacientes diabéticos (Lean, 1999; Asgary, 2002).

Muchas plantas han sido tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de la diabetes. Los polifenoles contenidos en estas plantas puede explicar parte de su actividad terapéutica (Marles,

1995; Gray, 1997). Los polifenoles pueden afectar la glucemia a través de diferentes mecanismos, incluyendo la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o de su absorción por los tejidos periféricos. Los efectos hipoglucemiantes de las antocianinas diacetiladas en una dieta a una dosis de 10 mg/kg se observaron con maltosa como fuente de glucosa, pero no con sacarosa o glucosa (Matsui, 2002). Esto sugiere que estos efectos son debidos a una inhibición de la α -glucosidasa en la mucosa intestinal. La inhibición de la α -amilasa y de la sacarasa en ratas por catequina en una dosis de aproximadamente 50 mg/kg de dieta o superior se observó también (Matsumoto, 1993). La inhibición de glicosidasas intestinales y transportador de glucosa por los polifenoles se ha estudiado *in vitro*. (Welsch, 1989; Gee, 2000).

Los polifenoles no sólo podrían inhibir la absorción de glucosa en el intestino delgado, sino que también podrían limitar su reabsorción en el riñón, como se ha demostrado para la florizina (Dimitrakoudis, 1992).

Varios estudios *in vitro* en células cultivadas han demostrado que los polifenoles pueden aumentar la captación de glucosa por los tejidos periféricos. El ácido cafeico aumenta la captación de glucosa por los adipocitos y mioblastos de rata o ratón (Cheng, 2000; Hsu, 2000). Extractos de té negro y verde también aumentaron la captación de glucosa por los adipocitos de rata, tanto en la presencia o ausencia de insulina (Anderson, 2002). Sin embargo, resultados opuestos informaron también que la quercetina y la genisteína, inhiben tanto la captación de glucosa inducida por la insulina en adipocitos de rata como de hidrógeno peróxido en líneas de células leucémicas (Shisheva, 1992; Fiorentini, 2001).

Los polifenoles pueden ejercer acciones diferentes en tejidos periféricos que puedan disminuir la glucemia. Estos incluyen la inhibición de la gluconeogénesis (Arion, 1997; Liu, 2000; Waltner-Law, 2002), estimulación adronérgica de la captación de glucosa (Cheng, 2000) o la estimulación de la liberación de insulina pancreática por las células β (Ohno, 1993). La implicación de estos mecanismos es todavía hipotético. El ácido p-hidroxibenzoico, que muestra los efectos hipoglucemiantes en ratas diabéticas cuando

se someten a una prueba de tolerancia a la glucosa, no tuvo efecto sobre la insulinemia y el glucógeno hepático (Peungvicha, 1998). Por el contrario, algunos polifenoles podrían tener efectos opuestos y provocar la disminución de la captación de glucosa en los tejidos periféricos mediante la inhibición del transportador de glucosa GLUT1, (Shisheva, 1992; Vera, 1996) .

En los seres humanos, la evidencia de los efectos de los polifenoles sobre la glucemia o el riesgo de diabetes es aún muy limitada. El consumo de 400 ml de café descafeinado no afecta la glucemia o insulinemia cuando se ingiere con glucosa, pero esto disminuyó la secreción de glucosa polipéptido insulínico dependiente y aumentó la del péptido similar al glucagón 1 de una manera consistente con un retraso en la absorción intestinal de glucosa (Johnston, 2003). Los efectos del consumo de suplementos de polifenoles también se evaluaron en pacientes diabéticos. No tiene efecto sobre la glucemia en los pacientes con diabetes tipo 2, después de 2 meses de consumo de 50 mg/día de suplemento rojo anaranjado que contiene antocianinas, flavanonas y ácidos fenólicos (Bonina, 2002). En otro ensayo clínico, los pacientes diabéticos tipo 1 en las dosis sugeridas más grandes de diosmina (1800 mg/día) y hesperidina (200 mg/día) en comprimidos para 3 meses. Aunque las dosis administrada por unidad de peso corporal fueron similares a muchos de los estudios con animales que se han descrito anteriormente, tal suplementación no tuvo ningún efecto sobre la glucemia, sino que redujo significativamente el nivel de hemoglobina glicosilada (HbA1c) (Manuel y Keenoy, 1999). Los polifenoles podrían, por lo tanto, limitar el riesgo de complicaciones de la diabetes, como el final de glicación avanzada (AGE) los productos se sabe que generan estrés oxidativo. Este efecto sobre los productos AGE podría explicar la reducción del daño renal por cúrcuma observado en las ratas tratadas con estreptozotocina (Suresh Babu, 1998).

La evidencia epidemiológica es también muy limitada. El consumo de café (rico en ácido clorogénico) ha sido asociado con un menor riesgo de diabetes tipo 2 (Van Dam, 2002). El consumo de café descafeinado (20 g/día de sólidos durante 14 días, es decir,

el equivalente a cerca de 10 tazas de café al día) redujo la glucemia en ayunas en voluntarios sanos (Naismith, 1970). El consumo de 400 ml de café descafeinado que contiene 25 g de glucosa en voluntarios sanos redujo el nivel postprandial de glucosa-polipéptido (GIP) insulínico dependiente y una mejora del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), lo que sugiere que el ácido clorogénico disminuye la tasa de absorción intestinal de glucosa (Johnston, 2003). El ácido clorogénico podría, por lo tanto, contrarrestar los conocidos efectos hiperglucemiantes de la cafeína.

Flavonoides y neurodegeneración:

Recientemente se propone que los flavonoides por sus efectos benéficos podrían ser un tratamiento alternativo en las enfermedades neurodegenerativas debido a que éstos son capaces de modular la función neuronal y prevenir la neurodegeneración. Además, el uso de flavonoides ha mostrado mejorar los procesos cognitivos, posiblemente mediante la protección de neuronas vulnerables a la muerte, así como a la mejora de la función neuronal existente (Commenges, 2000; David, 2008). Dada la relevancia que los flavonoides han adquirido recientemente estos compuestos han sido incluidos en el tratamiento contra la degeneración neuronal presente en patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP).

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* dan muestra del potencial de los flavonoides para proteger a las neuronas contra el daño provocado por diversas neurotoxinas. Su potencial neuroprotector se ha mostrado sobre dos mecanismos importantes: el estrés oxidativo y la neuroinflamación (Youdim, 2001) a través de modelos de muerte neuronal, por ejemplo el modelo con el péptido β -amiloide, el cual juega un papel importante en el desarrollo de la EA. También existen evidencias de que los flavonoides son capaces de mantener la integridad y funcionalidad de la sustancia negra compacta (SNpc) y del núcleo estriado de roedores tratados con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina empleada para generar un modelo de EP.

Por lo anterior, los flavonoides pueden ser empleados como agentes neuroprotectores en patologías como la EA y la EP, entre otras enfermedades degenerativas (Luo, 2002). Es importante destacar que los mecanismos de neuroprotección de los flavonoides se deben en particular a su capacidad de interactuar con la señalización neuronal y su potencial para inhibir los procesos inflamatorios en el cerebro (Chen, 2005).

En nuestro trabajo elegimos los flavonoides:

1. EXTRACTO DE FRESNO (E. FRESNO):

El extracto de fresno proviene de la semilla acuosa en polvo de la planta *Fraxinus excelsior* L., es una planta de la familia de las Olanaceas, también conocida como fresno común o fresno europeo. El extracto está caracterizado por diferentes tipos de componentes incluyendo secoiridoides, glucósidos, cumarinas, flavonoides, feniletanoides, benzoquinonas, derivados del indol y compuestos fenólicos simples. Los ingredientes activos contenidos en el fraxipure son los sercoiridoides, nuzhenida y G13.

Descripción botánica y usos en la medicina herbal tradicional:

La planta *Fraxinus excelsior* de la familia Olanacea, también es conocida como fresno común o fresno europeo, es distribuido a lo largo de las zonas templadas de Asia, Europa y de la región del sudeste de Marruecos (Tafilalet) (Bai, 2010). En Tafilalet, es localmente conocido como “l’assanel’ousfour” (Maghrani, 2004). Se trata de un árbol caduco que puede crecer entre 20 y 35 pies de altura y cuyas hojas están dispuestas en forma pinnada y agrupadas en grupos de 9 o 13 (Wright, 2007). Tradicionalmente, las semillas de *Fraxinus excelsior* se han consumido como frutos encurtidos y como condimentos en la Unión Europea (Kunkel, 1984). Extractos de las semillas y las hojas de *Fraxinus excelsior* también han sido usadas en la medicina popular en Marruecos por sus propiedades

antidiabéticas (Eddouks, 2004; Eddouks 2007). Los extractos de las semillas son caracterizados por diferentes clases de compuestos incluyendo glucósidos secoiridoides, cumarinas, flavonoides, feniletanoides, benzoquinonas, derivados del indol y compuestos fenolicos simples (Bai, 2010).

Farmacología *in vitro* e *in vivo*:

El extracto de fresno se propone para su uso en el manejo de los factores de riesgo asociados con el síndrome metabólico, como la obesidad, hiperglucemia y la hipertensión. También para aumentar la pérdida de peso en personas con sobrepeso por la inhibición de la diferenciación de adipocitos y por la inhibición del metabolismo de los lípidos a través del aumento de la modulación de la vía de señalización del PPAR α , la cual está involucrada en la regulación del metabolismo de lípidos y la homeostasis energética (Bai, 2010). Se ha propuesto que el extracto de fresno posee un efecto de disminución de los niveles de glucosa en sangre en individuos hiperglucémicos; el mecanismo de acción actualmente se desconoce, pero puede estar implicado en la reabsorción renal de la glucosa (Ibarra, 2011). Según el estudio de Eddouks (2005), podemos observar que el extracto de fresno tiene un efecto de disminución de los niveles de glucosa en sangre, particularmente en pacientes con hipertensión. Este resultado puede surgir, al menos, en parte como consecuencia del efecto diurético que posee dicho producto (Eddouks, 2005).

Farmacología clínica:

El efecto del extracto de fresno en la glucemia postprandial y la secreción de insulina se evaluó en voluntarios humanos sanos en un estudio aleatorizado, doble ciego, placebo-control, estudio cruzado (Visen, 2009). El objetivo de esta prueba fue confirmar si el extracto acuso de las semillas de *F. excelsior* reduciría la glucemia postprandial en personas no diabéticas, individuos sanos tras la ingesta de glucosa (50g). Los sujetos que participaron en el estudio

fueron 11 hombres y 5 mujeres no embarazadas con unas edades que comprendían entre 20 y 55 años con una media de niveles de glucosa en ayuno de $4,4 \pm 0,09$ mmol/L y con un índice de masa corporal (IMC) de $26 \pm 2,2$ kg/m². Los voluntarios ayunaron durante 10-12 horas antes de la ingesta de 1,000 mg de extracto de fresno, que se administró en cápsulas de 2,500 mg. Los participantes fueron desafiados a continuación con 50g de glucosa en solución. Los voluntarios mantuvieron su ingesta de carbohidratos habitual, el nivel de actividad física y patrones de estilo de vida durante todo el curso del estudio, y se les pidió evitar el ejercicio vigoroso el día anterior y la mañana de la administración de la dosis. La glucosa en sangre y los niveles séricos de insulina fueron medidos durante el estudio. Las muestras de sangre mediante un pinchazo en el dedo se obtuvieron a los -120, -90, -60, -45, -30, -15 y 0 minutos. Adicionales muestras de sangre se obtuvieron a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después del inicio de la bebida de glucosa. También se recogieron muestras de sangre venosa a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos para analizar la insulina. Una disminución no significativa en los niveles de glucosa postprandial tras la ingesta de extracto de fresno se observó dentro de 15 a 120 minutos comparado con el placebo. La diferencia en el área media bajo la curva tiempo-concentración para los niveles de glucosa plasmática fue significativamente diferente entre extracto de fresno y el placebo ($p=0,02$). Un significativo incremento ($55,5 \pm 4,6$ mU/L; $p=0,02$) en la secreción de insulina fue inducido tras el consumo de extracto de fresno a los 90 minutos comparado con el placebo ($43,5 \pm 5,0$ mU/L). No se observó ninguna diferencia significativa en los valores de las medias de insulina del AUC entre el extracto ($6041 \pm 340,5$ min·mU/L) y el grupo placebo ($5996,3 \pm 594,58$ min·mU/L). Los sujetos del estudio no reportaron efectos adversos o reacciones. Los resultados del estudio sugieren que el consumo agudo de extracto de fresno puede producir una ligera reducción en los niveles de glucosa en no diabéticos, individuos sanos sin alterar significativamente la secreción de insulina. Por lo tanto, los niveles de insulina podrían reducirse en las personas con un consumo crónico de extracto de fresno.

2. EXTRACTO DE SPERGULARIA (E. SPERGULARIA):

Spergularia purpurea es una planta lisa, sin hojas o pubescente que habita en suelos arenosos y que es originario de Asia y Europa. Existe documentación en la cual se habla de la utilización de Spergularia purpurea en la medicina tradicional marroquí; se prepara en extracto acuoso a partir de toda la planta y se utiliza en el tratamiento de la enfermedad renal, hipotensión, y la diabetes (Jouad, 2001a; Eddouks, 2002), y también se utiliza tradicionalmente como antiséptico, diurético, el apoyo del sistema nervioso y sedante.

Farmacología *in vivo* e *in vitro*:

El extracto de spergularia purpurea se ha probado *in vitro* en diversos ensayos, lo que permitió demostrar que activa (respectivamente 22% y 16% de la actividad de fenofibrato, la droga más fuerte de referencia) al PPAR- α y PPAR- γ (receptores nucleares relacionados con el control de la lipidemia, colesterolemia y glucemia). Además, se ha demostrado que la Spergularia purpurea puede promover la secreción de glucagón similar al péptido-1 ((GLP-1) en las células STC-1 (células neuronales murinas enteroendocrinas) de una manera dependiente de la dosis. Las células que se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de spergularia mostraron un incremento del 40% en la producción de GLP-1, comparadas con las células que no fueron expuestas al extracto de spergularia.

Los estudios *in vivo* demostraron que el extracto de spergularia, administrada a 10 mg/kg, reduce significativamente la glucosa en sangre en ayunas ($p < 0,01$) y reduce significativamente el peso corporal ($p < 0,01$), el 4% en ratas normales y el 16% en ratas a las cuales se les ha inducido la diabetes después de 15 días de tratamiento (Jouad, 2000). Además, se ha encontrado una actividad reductora de colesterol del extracto de spergularia purpurea en ratas normales y en ratas con diabetes reciente (Jouad, 2003).

El glucagón como el péptido-1 (GLP-1) es una hormona gastrointestinal, secretada principalmente después de las comidas,

lo que aumenta la glucosa inducida por la secreción de insulina e induce la saciedad (Rotella, 2005). GLP-1 también estimula la utilización de glucosa por aumento de sensibilidad a la insulina e inhibe la liberación de glucagón, inhibiendo con ello la vía de glucogénesis (Holst, 2008). Esta vía podría ayudar a explicar las disminuciones significativas en los niveles de glucosa en sangre observados previamente (Jouad, 2000).

La capacidad del extracto de spergularia para secretar GLP-1 podría explicar, en parte, el efecto reductor de la glucemia observado en ratas normales y ratas a las que se le ha inducido la diabetes por la administración oral (Jouad, 2000), reducción de colesterol (Jouad, 2003), y la reducción del peso corporal en ratas (Jouad, 2000). Por lo tanto, el extracto de spergularia es un buen candidato para controlar los efectos negativos del síndrome metabólico, tales como la hiperglucemia y niveles altos de colesterol.

Además, en otro estudio se administraron de extracto de spergularia purpurea y placebo a ratas normales, observando que el volumen de orina fue significativamente mayor en 4 semanas de tratamiento, demostrando el efecto diurético del extracto de spergularia (Jouad, 2001b). Asimismo, los efectos antihipertensivos y diuréticos de los flavonoides extraídos del extracto de spergularia fueron estudiados ambos en ratas normotensas (NTR) y espontáneamente hipertensas (SHR). La administración oral diaria de la mezcla de flavonoides (5 mg/kg durante una semana) mostró una disminución significativa de la presión arterial con el coeficiente de variación (Δ) de 20 en las ratas SHR y de 11 en las ratas NTR. La presión arterial sistólica y diastólica se redujo significativamente y respectivamente con un 17 y 24% en las ratas SHR y un 11 y 16% en las ratas NTR (Jouad, 2001c). También se observó un efecto diurético adicional.

A pesar de que, hasta la fecha, no se han realizado estudios clínicos sobre la ingesta de extracto de spergularia para conocer con profundidad sus posibles propiedades para la salud, puede contribuir a reducir la resistencia a la insulina y la hipertensión, haciendo del extracto de spergularia un fuerte candidato para la prevención del síndrome metabólico.

3. EXTRACTO DE GRANADA (E. GRANADA):

El extracto de granada se obtiene de la corteza de *Punica granatum* (granada). Son ricos en polifenoles, especialmente taninos, taninos elágicos, antocianinas, catequinas y ácidos gálico y elágico. El extracto de granada tiene un largo historial de consumo humano como tal, como jugo o añadido como componentes de complementos alimenticios o dietéticos.

El ácido púnico (PUA), también conocido como ácido trichosanico, es un trieno conjugado de ácido graso que se encuentra naturalmente en altas concentraciones en la semilla de *Punica granatum* (Sassano, 2009) y *Trichosanthes kirilowii* (Joh, 1995). PUA constituye 64-83% de los el aceite de semilla de granada (Kaufman, 2007). Además de PUA, el extracto de granada también contiene en menor cantidad isómeros de ácido linoleico incluyendo el ácido eleosteárico (ESA) y ácido catalpico (CAT) (Sassano, 2009). Los fitosteroles (beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol) también se encuentran en una alta concentración en el extracto de granada (4089-6205 mg /kg de extracto de granada) (Kaufman, 2007), todos estos compuestos puede contribuir al espectro general de los beneficios de salud observados.

Descripción botánica:

Un atractivo arbusto o árbol pequeño, de 6 ó 10 metros de alto, el árbol de la granada es muy ramificado, más o menos espinoso y con una vida muy larga, algunos especímenes en Versalles se sabe que han sobrevivido a dos siglos. Tiene una fuerte tendencia a arraigarse. Las hojas son perennes o caducas, opuestas o en verticilos de 5 ó 6, de tallo corto, oblongo-lanceoladas, de 10,01 cm de largo, correoso. Las flores, vistosas, se encuentran en las puntas de las ramas, solas o en racimos de hasta 5 flores. Son 3 cm de ancho y se caracteriza por el espesor, cáliz tubular, escarlata, que tenía 5-8 sépalos carnosos y puntiagudas formando un jarrón del que emergen los 3 a 7 plisados, pétalos de color rojo, blanco o abigarrado que encierra el numerosos estambres. Casi todo el año, pero coronado en la base por el cáliz prominente, la fruta, 6,25-12,5

cm de ancho, tiene una piel dura y correosa o cáscara, en el fondo de color amarillo más o menos superpuestas con la luz o profunda rojo, rosa o ricos. El interior está separado por paredes membranosas y el tejido blanco esponjoso (trapo) en compartimentos llenos de bolsas transparentes llenas de tarta, sabroso, carnosos, pulpa jugosa, roja, rosa o blanco (técnicamente el arilo). En cada saco, hay una semilla de color blanco o rojo, angular, blando o duro. Las semillas representan aproximadamente 52% del peso de la fruta entera.

Pomegranate y la medicina tradicional:

Antes de que sus propiedades medicinales fueran descritas el extracto de granada era considerado sagrado por muchas de las principales religiones del mundo. El extracto de granada representa la vida, la regeneración y el matrimonio en la mitología griega, la invencibilidad de la mitología persa, y la esencia de la influencia favorable en el arte budista. El extracto de granada simboliza la fertilidad, la abundancia y la prosperidad en Japón y el arte en China, así como entre los beduinos de Oriente Medio, la resurrección y la vida eterna en el arte cristiano. El extracto de granada pertenece a los jardines celestiales del paraíso descrito en el Corán y sus frutos decoran los pilares del templo del rey Salomón y los trajes e insignias de los reyes judíos y sacerdotes. La Asociación Médica Británica y tres colegios reales comprenden la granada en sus escudos de armas desde el siglo XVI (Langley, 2000). En la medicina tradicional, el pericarpio del extracto de granada se utiliza para el tratamiento de bronquitis, fiebre, enfermedades gastrointestinales, menorragia, infecciones del tracto respiratorio, erupciones cutáneas, infecciones vaginales y lombrices. Su uso, tal como se describe en las farmacopeas, cubre el tratamiento oral de la diarrea crónica, la disentería, la gingivitis y parásitos intestinales.

Farmacología *in vitro* e *in vivo*:

In vivo, los extractos y los fenoles del extracto de granada han demostrado actividad antioxidante, el óxido nítrico protege de la destrucción oxidativa y reducción de estrés oxidativo de los macrófagos (Gil, 2000; Ignarro, 2006; Li, 2006; Rozenberg, 2006; Aviram, 2008). Otros estudios demostraron que el extracto de granada puede retardar la proliferación de células de cáncer de próstata (Malik, 2005; Pantuck, 2006; Malik, 2006) a través de la inhibición de CYP1B1 (Kasimsetty, 2009) así como células de cáncer de colon (Kasimsetty, 2010). Se ha sugerido que los efectos antioxidantes/antiaterogénicos ejercidos por el jugo del extracto de granada podría ser debido a la presencia de azúcares complejos únicos y/o azúcares fenólicos (Rozenberg, 2006). Las punicalaginas fueron sugeridas como los activos de los elagitanos anoméricos responsables de más del 50% del potencial antioxidante del jugo (Cerdeira, 2003a).

Los estudios en animales se han centrado en el efecto de la granada en la hipertensión y la función arterial. En ratas Wistar diabéticas, una administración crónica del extracto de granada (100 mg/kg y 300 mg/kg; durante 4 semanas) redujo la presión sanguínea arterial media y revirtió los cambios bioquímicos inducidos por la diabetes y Ang II, probablemente por la inhibición de la actividad de ECA (Mohan, 2010). En ratas Zucker obesas, la suplementación con extracto de granada disminuyó significativamente la expresión de marcadores de inflamación vascular, trombospondina y citoquinas TGFbeta1 ($p < 0,05$) y el aumento de la expresión de la NO sintasa endotelial. El nitrato del plasma y los niveles de nitrito se incrementaron de manera significativa por los extractos de fruta de la granada ($p < 0,05$). Este estudio concluyó que los extractos de la granada pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la función arterial en ratas Zucker obesas (de, 2007). Estudios realizados en ratones ateroscleróticos que fueron alimentados con extractos de granada o jugo a unos niveles de 200 μ g de equivalente de ácido gálico al día durante 3 meses mostró una disminución de tamaño de la lesión aterosclerótica sin efectos significativos en los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y glucosa. Además, el zumo de

extracto de granada disminuye el colesterol sérico y la peroxidación lipídica y aumenta los niveles séricos de paraoxonasa en ratones. La captación de LDL se redujo en 27% en los macrófagos peritoneales de ratones en comparación con ratones tratados con placebo (Aviram, 2008).

Farmacología clínica:

Extractos de granada también han demostrado efectos beneficiosos sobre las funciones cardiovasculares (Larrosa, 2010). Varios estudios de intervención en humanos se llevaron a cabo de forma segura utilizando zumo de extracto de granada, lo que demuestra sus efectos beneficiosos sobre el tiempo de coagulación (Polagruto, 2003), los niveles de LDL (Esmailzadeh, 2004), isquemia inducida por esfuerzo (Sumner, 2005), la oxidación lipídica (Guo, 2008; Rock, 2008), la fuerza muscular esquelético (Trombold, 2010) y la hipertensión (Aviram, 2001; Aviram, 2004). Además, el jugo de extracto de granada (50 ml/día) aumentó HDL paraoxonasa-1 recombinante de unión a lipoproteínas de alta densidad cuando se administra a 6 pacientes diabéticos durante un mes (Fuhrman, 2010). Los extractos de granada han demostrado potencial quimiopreventivo en varios estudios *in vivo* e *in vitro*: Sobre el cáncer de colon (Kasimsetty, 2010), el cáncer de mama (Khan, 2009), así como el cáncer de próstata (Malik, 2005; Malik, 2006; Pantuck, 2006; Kasimsetty, 2009).

Seguridad y farmacocinética:

En los animales, el metabolismo y la farmacocinética de ambos, el ácido elágico (Smart, 1986; Teel, 1988; Whitley, 2003) y punicalaginas fueron estudiados (Cerdeja, 2003a; Cerdeja, 2003b). Los posibles efectos tóxicos de un extracto de granada estandarizado al 30% de punicalagina fueron investigados en ratas. La dosis oral letal 50% (LD50) del extracto en ratas y ratones se encontró que era mayor que 5 g de peso corporal / kg (Patel, 2008). Además, la seguridad de la administración oral repetida de un 6% de

punicalagina que contiene la dieta también fue encontrado en ratas Sprague-Dawley de 37 días (Cerde, 2003a).

En los seres humanos, los estudios farmacocinéticos tras el consumo agudo de 800 mg de extracto de granada indicó que el ácido elágico fue altamente biodisponible, con una C_{max} observada de 32-33 ng/ml en T_{max} de 1 hr, y se elimina rápidamente en 4 horas. Sin embargo, estas concentraciones pueden no ser representativas de la concentración de ácido elágico libre en el plasma ya que se une fuertemente a las proteínas y pueden proceder de hidrólisis de punicalaginas (Seeram, 2004; Mertens-Talcott, 2006). Los metabolitos plasmáticos urolitinas A y B, hidroxilo urolitina A, urolitina A-glucurónido (hasta 2 ng/g), y ácido elágico dimetil-glucurónido fueron identificados. La capacidad antioxidante se aumentó con un efecto máximo de 32% después de 0,5 horas, mientras que la generación de especies reactivas de oxígeno no se vio afectada (Mertens-Talcott, 2006). Metabolitos y parámetros farmacocinéticos similares se observaron cuando la administración de zumo de extracto de granada y extractos de frutas, pero se observó un retraso en la T_{max}, $2,58 \pm 0,42$ h para el extracto de la fruta (Seeram, 2008). Extractos de granada, zumo o componentes principales fueron utilizados en al menos 15 intervenciones humanas o estudios clínicos sin ningún acontecimiento adverso observado (Larrosa, 2010).

Por lo tanto podemos decir que el extracto de granada mostró un perfil de seguridad favorable y puede ser eficaz en la reducción de los parámetros inflamatorios, mejora de las funciones cardiovasculares y como agente quimiopreventivo.

III. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro trabajo consistió en estudiar los efectos de diferentes compuestos polifenólicos (Extracto de fresno, Extracto de spargularia y Extracto de granada) sobre un modelo experimental de diabetes en ratones diabéticos LepR^{db/db} a través de:

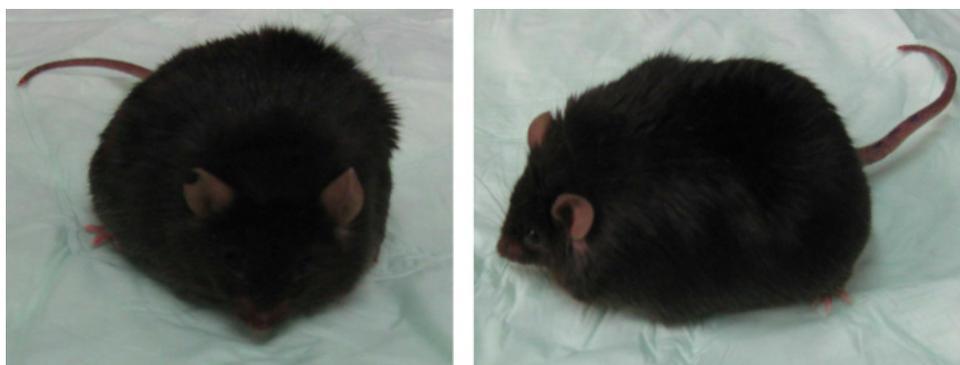
- 1) La evolución del peso corporal y el índice de conversión alimenticio de los animales estudiados.
- 2) Los marcadores relacionados con la glucemia: glucosa plasmática, insulina, hemoglobina glicosilada, homar-ir y parámetros bioquímicos generales.
- 3) Estudiar, mediante histomorfometría, la morfología de los páncreas.
- 4) Deterioro cognitivo relacionado con la diabetes: biomarcadores y test de conducta.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL

1. Animales de experimentación:

Hemos utilizado 40 ratones hembras $LepR^{db/db}$, procedentes del Harlan Laboratorios S.L. (Barcelona, España), de cinco semanas de vida y un peso medio al comienzo de los experimentos de $33\pm 3g$. Estos animales poseen un gen alterado que se localiza en el cromosoma 4 y codifica una mutación puntual (G a T) en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria. La mutación db/db muestra muchas de las características de la DM 2 humana. Los ratones db/db son insensibles al suministro de leptina exógena. Estos animales primero sufren obesidad precoz con hiperinsulinemia, posteriormente desarrollan diabetes y finalmente fallo pancreático y muerte por diabetes descompensada. En estos especímenes la hipersecreción de insulina es un hecho común (Chen, 1996; Sharma, 2003; Campfield, 1996; Like, 1972).



Figuras 12 y 13. Ratón $LepR^{db/db}$.

Los animales fueron mantenidos en cajas de $480 \times 270 \times 200cm$, en rack ventilado y utilizados siguiendo las normas de la UE para la protección de animales utilizados en experimentación (86/609/CEE). Cada ratón fue identificado mediante un código de marcaje en las orejas.

Las condiciones ambientales se han mantenido de manera constante (en el Servicio de Animales de Laboratorio del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia) a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, temperatura estable entre 22-24°C, humedad constante entre 55%-10%.

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético local y en todos los procedimientos se respetó la normativa sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (R.D. 1201/2005).

2. Aparatos

Rack ventilado: "Touch Slim Plus", Laboratorio: Tecniplast, Buguggiate, Italia.

Balanza de precisión: Scout Pro SPU402. Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ USA.

Glucómetro: "Sistema de monitorización de glucemia", ACCU-CHEK, Compact Plus, Laboratorio: Roche, Mannheim, Alemania

Tiras reactivas: Para la determinación de la glucosa, Sólo para ACCU-CHEK, Compact Plus, Laboratorio: Roche, Mannheim, Alemania.

Analizador de bioquímica: VetScan Practice, Laboratorio: Abaxis, Darmstadt, Alemania.

Rotores: para la realización de las bioquímicas. VetScan, Laboratorio: Abaxis, Darmstadt, Alemania.

Centrifugadora: Spectrafuge Mini, Laboratorio: Labnet Internacional, Woodbridge, EEUU.

Kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): Zeleste Diagnostic, Laboratorio: Etyca Research, Barcelona.

Espectrofotómetro para medir absorbancia a 450 nm: Espectrofotómetro Omega BMG, Laboratorio: LabTech, Ortenberg, Alemania.

Rota-rod, Laboratorio: Ugo Basile, Comerio V.A., Italia.

Actímetro, Laboratorio: Panlba, Barcelona, España.

Grip test, Laboratorio: Bioseb, Chaville, Francia.

Pole test, Laboratorio: Panlab, Barcelona, España.

Escaner: Leica SCN 400F . Leica, Microsystems, Wetzlar, Germany.

3. Agentes

- Extracto de Fresno (E. Fresno): Corteza de la semilla del fresno, Laboratorio Naturex S.L, Avignon, Francia.
- Extracto de Spergularia (E.Spergularia): Spergularia Purpurea, Laboratorio Naturex S. L, Avignon, Francia.
- Extracto de Granada (E. granada): Punica granatum, Laboratorio Naturex S. L, Avignon, Francia.

1) **EXTRACTO DE FRESNO (E. FRESNO):**

El extracto de fresno es un extracto de la semilla acuosa en polvo de la planta *Fraxinus excelsior* L., es una planta de la familia de las Olanaceas, también conocida como fresno común o fresno europeo. El extracto esta caracterizado por diferentes tipos de componentes incluyendo secoiridoides, glucósidos, cumarinas, flavonoides, feniletanoides, benzoquinonas, derivados del indol y compuestos fenolicos simples. Los ingredientes activos contenidos en el fraxipure son los sercoiridoidies, nuzhenida y GI3. Fraxipure fue notificado con éxito como un ingrediente alimentario para su uso en complementos dietéticos en la Unión Europea.

El extracto de fresno es un extracto acuoso natural producido por las semillas de *Fraxinus excelsior* (o semillas de fresno europeo) de Marruecos (planta: extractos de relación entre 5:1 y 7:1). Es un polvo de color entre beis y marrón claro y con un sabor característico. El extracto de fresno se compone de secoiridoides, principalmente nuzhenida (>7%) y GI3 (>4%) y son los ingredientes activos. La estructura química de los dos principales componentes se presentan a continuación:

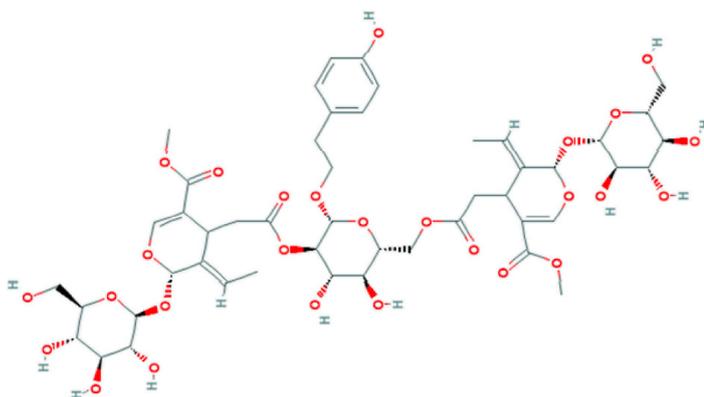


Figura 14. Estructura química: GI3

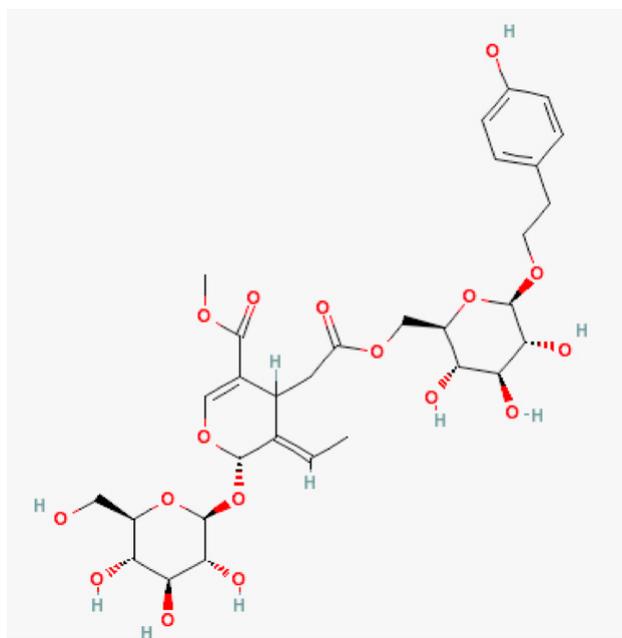


Figura 15. Estructura química: Nuzheinide

2) **EXTRACTO DE GRANADA (E. GRANADA):**

El extracto de granada es rico en polifenoles, especialmente taninos, taninos elágicos, antocianinas, catequinas y ácidos gálico y elágico. El extracto de granada tiene un largo historial de consumo humano como tal, como jugo o añadido como componentes de complementos alimenticios o dietéticos.

El extracto de granada se obtiene a partir de la corteza de *Púnica granatum* L. (planta: relación extracto entre 5:1 y 7:1). La extracción del disolvente contiene 70% de etanol / 30% de agua. Los polifenoles del extracto de granada, en particular elagitaninos, taninos hidrolizables que liberan ácido elágico en el tracto gastrointestinal pueden estar implicados en los beneficios cardiovasculares de los extractos de la granada (Espin, 2007). Punicalaginas son elagitaninos específicos del extracto de granada. El zumo del extracto de granada puede contener 2020-2660 mg/L de elagitaninos y ácido elágico, y 1500-1900 mg/L de punicalaginas (Gil, 2000; Larrosa, 2010). La punicalagina (CAS No.: 65995-63-3), es única para la fruta de la granada y puede ser utilizado como un marcador de control de calidad para el jugo o extracto (Zhang, 2009).

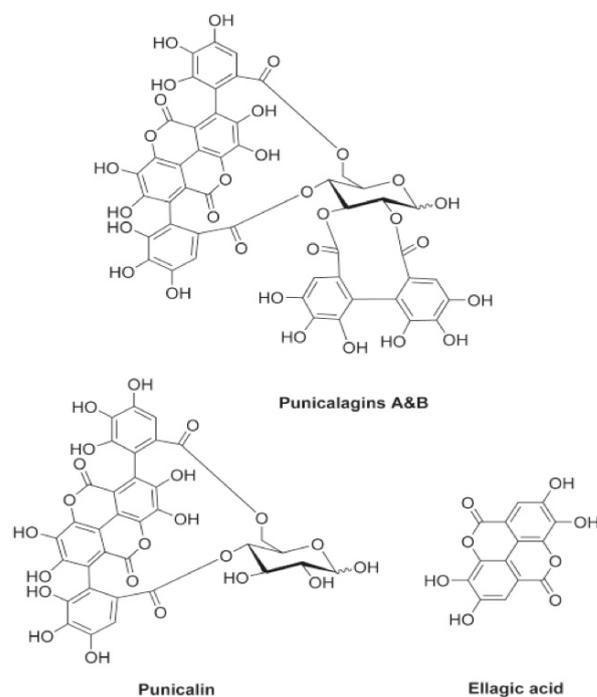


Figura 16. Estructuras química de los compuestos del E. Granada.

	Content (%)
Total punicalagins content	> 5.0
Ellagic acid content	> 1.2
Polyphenols content	> 50
Carbohydrates	86.5
Protein	2.8
Fat content	1.1
Moisture content	3.8
Fibers	4.2
Ashes	4.4

Tabla 1. Composición química y nutricional para los extractos de granada.

3) ***EXTRACTO DE SPERGULARIA (E. SPERGULARIA):***

Spergularia purpurea es una planta lisa, sin hojas o pubescente, perteneciente a la familia Caryophyllaceae. Es originaria de Asia, Europa y Marruecos. Se encuentra en bordes de caminos, céspedes, en todo caso en lugares despejados, arenosos, soleados, sin vegetación alta en su entorno. Florece a final de primavera y en verano.

II. MÉTODOS

Procedimiento experimental:

Los animales utilizados en nuestro estudio se repartieron en cuatro grupos (n= 10): un grupo control (I) y tres grupos de tratamiento (II, III y IV).

- Grupo I: Control: agua y comida ad libitum (n= 10). Los animales del grupo I no recibieron ningún tipo de tratamiento.
- Grupo II: Grupo E. Fresno: Se administró E. Fresno en la comida ad libitum (n=10). La dosis fue 0,715 g de producto/ kg de pienso preparado para ratón.
- Grupo III: Grupo E. Spergularia: Se administró E. Spergularia en la comida ad libitum (n=10). La dosis fue 0,5 g de producto/ kg de pienso preparado para ratón.
- Grupo IV: Grupo E. Granada: Se administró E. Granada en la comida ad libitum (n=10). La dosis fue 2,6 g producto/kg de pienso preparado para ratón.

DETERMINACIÓN DEL PESO

Una vez a la semana se determinó el peso de cada ratón mediante balanza equilibrada, se realizó la media de peso por grupo para valorar la evolución del peso en cada mes de tratamiento.

Determinación de la ingesta

La ingesta de alimento se determinó por animales separados en diferentes jaulas (5 ratones/jaula). La cantidad de comida ingerida por animal se obtuvo de la diferencia entre la cantidad inicialmente adicionada y la cantidad remanente trascurrida una semana dividido entre la cantidad de ratones por jaula. El resultado se expresó como la ingesta de alimento en gramos por día y animal. Se calculó el índice de conversión en función del peso y de la ingesta. Este parámetro expresa la mayor o menor eficiencia del alimento en su transformación en carne. Cuanto más bajo resulte mejor es el comportamiento del grupo. Se puede hablar del índice de conversión acumulado (el más utilizado) o el que corresponda a un período determinado.

Índice de conversión= consumo pienso (g)/ peso (g)

Se calcula por grupo en función del incremento de peso del grupo (gramos) al mes/ media de pienso ingerida (gramos) al mes.

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PLASMÁTICOS

Se obtuvieron determinaciones de sangre a la llegada del ratón con 5 semanas, a los 3, 4, 6 meses y al sacrificio del ratón con 7 meses.

La máxima sangre extraída en cada extracción era de 400µl, para no superar el 10% del volumen de sangre total del animal (volumen total de sangre aproximado de 2.5ml). La obtención de suero se obtenía pinchando al ratón en la vena coccígea del pómulo del ratón y recogiendo la sangre mediante capilar. Inmediatamente después la sangre se centrifugaba a 2500 rpm a 10°C durante 15 minutos para obtener el suero, que se separaba en diferentes alícuotas y se congelaba a -20°C hasta el momento de su utilización.

Determinación de muestras plasmáticas por técnicas de ELISA:

Se determinaron mediante técnicas de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) los siguientes parámetros plasmáticos: AGL, adiponectina, TNF- α , insulina y péptido β - amiloide. Las etapas para la realización de los ELISA fueron las mismas para todos, se describen a continuación:

- 1) Tapizado del pocillo con el anticuerpo.
- 2) Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos.
- 3) Unión del antígeno al anticuerpo tapizado en el pocillo.
- 4) Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
- 5) Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima.
- 6) Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo.
- 7) Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida.
- 8) Adición del substrato.
- 9) Unión del substrato a la enzima.
- 10) Desarrollo del color.

- 11) Lectura colorimétrica del producto final coloreado mediante lector de placas, obteniendo los valores de absorbancia o densidad óptica en espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda, y determinando la concentración mediante regresión lineal tras multiplicar el resultado por el factor de dilución.

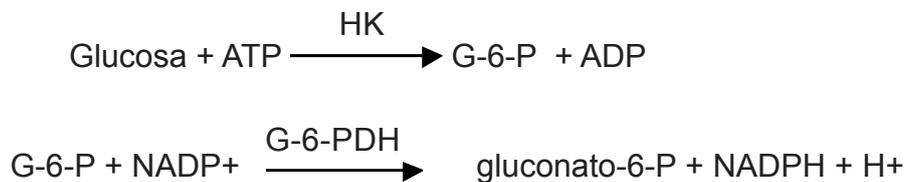
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON LA GLUCEMIA

Determinación de la glucosa sanguínea:

La glucosa circulante se determinó semanalmente por la tarde a la misma hora partir de una gota de sangre (5 μ L) procedente de la cola de los ratones, mediante el glucómetro.

A partir del 4^o mes los ratones presentaban una glucosa superior a 600mg/dl y no podía ser detectada por glucómetro por lo que se realizó extracción sanguínea del pómulo y se obtuvo el suero tras la centrifugación de la sangre a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C al 4^o, 6^o y 8^o mes. Para obtener unos valores dentro de los límites de detección se hizo una dilución del suero 1:5. La técnica empleada fue mediante test por radiación ultravioleta. La glucosa se fosforila con hexocinasa (HK) en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) e iones de magnesio para producir glucosa-6-fosfato y difosfato de adenosina (ADP). La 6-fosfato de glucosa deshidrogenasa (G6P-DH) oxida específicamente el 6 fosfato de glucosa y produce 6-fosfato de gluconato con la correspondiente reducción de NAD⁺ a NADH. El aumento de la absorbancia hasta 340nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

La glucosa diluida fue realizada en el laboratorio de análisis clínicos veterinarios de la Universidad de Murcia (Profesor José Joaquín Cerón Madrigal)



Determinación de la insulina plasmática:

La determinación de los niveles de insulina se estimaron en el 6^o mes mediante Kit de ELISA para ratones Mouse Insulin (Zelesste

Diagnostic) con un rango del análisis de 0,3 mU/L-15mU/L. La muestra era diluida a 1:5, por lo que solo se necesitaba un volumen de 10 µl por muestra.

Determinación del parámetro HOMAR-IR:

El HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) es un modelo matemático presentado por Matthews y cols. (1985) que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas. Para el cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glucosa } (\text{mg/dl})}{405}$$

405

Un índice HOMA mayor de 2 indicaría insulinoresistencia. Si una persona tiene un índice HOMA mayor a 3, existe una muy elevada posibilidad (> 90%) de tener resistencia a la insulina.

Determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c):

La hemoglobina glicosilada fue realizada en el laboratorio de análisis clínicos veterinarios de la Universidad de Murcia (Profesor José Joaquín Cerón Madrigal)

La determinación de los niveles de HbA1c se estimó en el 7º mes. El examen directo de HbA1c es un ensayo enzimático en el cual muestras enteras de sangre a las cuales se les realiza un proceso de lisis se someten a una digestión extensa de proteasas mediante el *Bacillus sp* proteasa. Este proceso libera los aminoácidos, incluyendo las valinas glicosiladas de las cadenas beta de la hemoglobina. Las valinas glicosiladas sirven luego de sustrato para la enzima recombinante, valina fructosil oxidasa (FVO), producida en la *E. Coli*. El recombinante FVO específicamente corta el terminal N de las valinas

y produce peróxido de hidrógeno. Éste, a su vez, se mide usando una reacción catalizada de peroxidasa de rábano blanco (POD) y una sustancia cromógena adecuada. En este ensayo enzimático directo de HbA1c no se requiere una medida separada para la hemoglobina total (Hb).

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS GENERALES

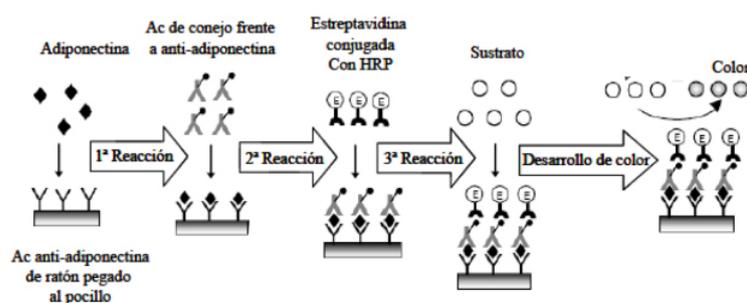
A los tres, cinco meses y siete meses se obtuvieron muestras de sangre en tubos de heparina de litio mediante punción de la vena mandibular.

Este estudio se realizó en el mismo día de la extracción de la sangre. Una vez obtenida la muestra de sangre de cada ratón se procedió a colocar en un rotor, el cual se introdujo en el analizador de bioquímica (VetScan). El volumen de sangre requerido para realizar este análisis era de 100µl.

Los parámetros medidos fueron: Albúmina, Fosfatasa alcalina, Alanina aminotransferasa, Amilasa, Bilirrubina total, Urea nitrógeno, Calcio, Fósforo, Creatinina, Sodio enzimático, Potasio enzimático, Proteína total y Globulina.

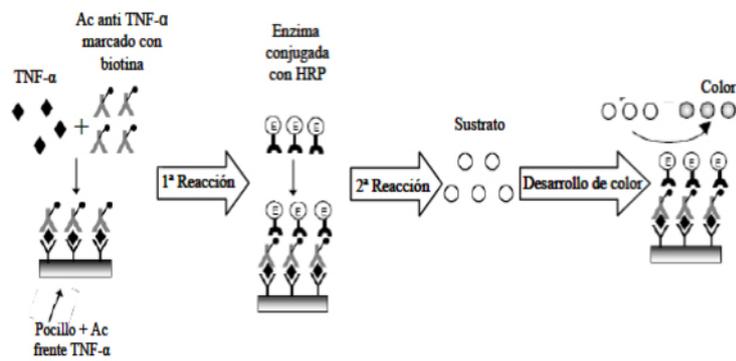
Determinación de adiponectina plasmática:

Para conocer el estado inflamatorio de los animales tratados con flavonoides y como marcador del tejido adiposo se midió la concentración de adiponectina a la llegada del ratón (5 semanas), en el 3º mes y en el 6º mes. Se determinó en el suero con un kit de ELISA para ratón: Mouse Adiponectin (ADP) ELISA Kit (Zelesste Diagnostic) con un rango del análisis de 0,93 µg/ml-100 µg/ml. La muestra era diluida a 1:5, por lo que solo se necesitaba un volumen de 10 µl por muestra y el resultado final se obtenía tras multiplicar el resultado por el factor de dilución. La reacción esquematizada es la siguiente:



Determinación de TNF- α plasmático:

Los valores de TNF- α se determinaron en el suero del ratón en el mes 0, 3 y 6 mediante Kit de ELISA para ratones Mouse Tumor Necrosis Factor α ELISA kit (ETYCA SL. Barcelona) con un rango del análisis de 2,5 pg/ml-50pg/ml. La muestra era diluida a 1:5, por lo que solo se necesitaba un volumen de 10 μ l por muestra. La reacción esquematizada se muestra a continuación:



DETERIORO COGNITIVO RELACIONADO CON LA DIABETES: BIOMARCADORES Y TEST DE CONDUCTA

Determinación de péptido β -amiloide plasmático:

Para evaluar enfermedad neurodegenerativa se determinó el péptido β -amiloide en el 6º mes mediante Kit de ELISA para ratones Mouse Amyloid Beta Peptide (A β) ELISA kit (Zelesse Diagnostic) con un rango del análisis de 1,8 pg/ml-200pg/ml. La muestra era diluida a 1:5, por lo que solo se necesitaba un volumen de 10 μ l por muestra.

Determinación de homocisteína:

La homocisteína fue realizada en el laboratorio de análisis clínicos veterinarios de la Universidad de Murcia (Profesor José Joaquín Cerón Madrigal)

La concentración de homocisteína se determinó en plasma en el 7º mes mediante inmunoensayo competitivo. Se determina mediante Kit de homocisteína IMMULITE, con un rango de análisis de 2-50 μ mol/L. La homocisteína de la muestra va a ser reducida a homocisteína libre y posteriormente, será transformada a S-adenosil-homocisteína (SAH). La S-adenosil-cisteína (SAC) conjugada, añadida al comienzo de la reacción, va a competir con la SAH de la muestra en la unión a los anticuerpos Anti-SAH unido a las partículas de poliestireno. En presencia de SAH o no hay agregación o sólo hay una agregación muy débil de partículas. En ausencia de SAH ocurre una agregación de partículas de poliestireno por medio de SAC conjugada. Cuanto más alto es el contenido de SAH en la mezcla de la reacción, más pequeña va a ser la señal de luz dispersada.

Determinación de test de conducta:

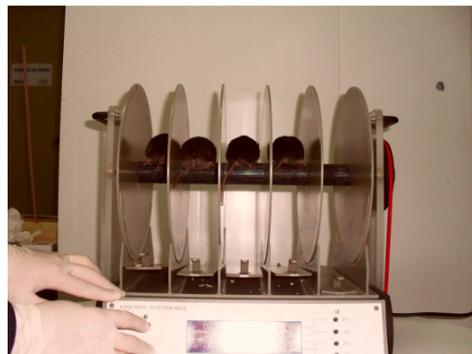
Los test de conducta han sido realizados en el laboratorio Nyce-ciberned de la Universidad de Murcia (Profesora María Trinidad Herrero Ezquerro).

Para valorar si existía o no algún tipo de degeneración neurológica se le realizaron a todos los animales los siguientes test:

- 1) Rota-Rod: es una prueba utilizada para evaluar la coordinación sensorio-motora y de aprendizaje motor en modelos de roedores de los trastornos del sistema nervioso central. Los sujetos se colocan en una varilla giratoria, ya sea con rotación constante o una aceleración determinada. La latencia a caer se registra. Los sujetos caen por debajo de la varilla giratoria. En nuestro caso, la prueba se realiza durante cuatro días y se hacen tres ensayos por día dejando entre los mismos un tiempo de descanso de 15 minutos. Una vez colocados los ratones, se inicia la rotación incrementándose la velocidad de 4 rpm hasta 40 rpm en 5 minutos. Éste es el tiempo máximo que los animales llegan a estar realizando la prueba.

La técnica de Rota-Rod la describieron en 1957, Dunham y Miya y ha demostrado gran valor en la investigación sobre detección de drogas que son potencialmente activa en la coordinación motora.

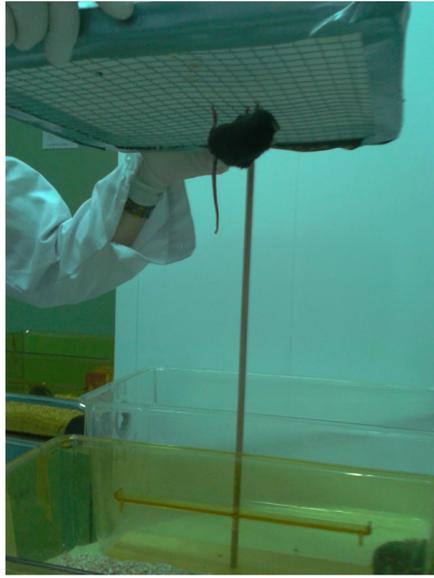
Se compone básicamente de cinco tambores de 3 cm de diámetro, adecuadamente mecanizados para proporcionar agarre. Seis pestañas dividen los tambores, lo que permite poner a cinco ratones en la cinta de forma simultánea.



- 2) Actímetro (Actividad Motora Espontánea): Consiste en hacer registros automatizados durante 5 minutos del movimiento espontáneo de cada animal en un campo abierto de dimensiones de 60 x 40 cm. El roedor es colocado en el centro del campo abierto. El sistema permite el registro de la exploración tanto en el plano horizontal (*number of crossing*) como en el vertical (*number of rearing*), así como también localizar el animal cerca a las paredes (tiempo en la periferia) o en el centro (tiempo en el centro). El dispositivo es un sistema creado por el CAID-SACE de la Universidad de Murcia. Está equipado de 32 fotocélulas, 16 localizadas en el eje X y otras 16 localizadas en el eje Y. Su registro es por infra-rojos con longitud de onda de 950 nm. Este tipo de sistema permite registros de actividad motora para roedores de forma automatizada conectada al ordenador.



- 3) Grip test: se realiza para evaluar la fuerza de agarre. Los ratones son colocados sobre una rejilla, inmediatamente se da la vuelta a la caja 180 grados, dejando al animal boca abajo. Se mide el tiempo que tarda en caer con un tiempo límite (latencia máxima) de dos minutos. Se hacen 4 ensayos por animal y día, durante 3 días consecutivos. La altura de la rejilla una vez dada la vuelta a la caja es de unos 50 centímetros para que el animal no se tire espontáneamente por falta de miedo.



- 4) Pole test: se realiza para evaluar la actividad locomotora del ratón. Éste es colocado con la cabeza hacia arriba en la parte superior de un poste de madera de 50 cm de alto y 1 cm de diámetro. Los ratones son entrenados durante dos días registrando el tiempo que tardan en dar la vuelta y el tiempo que tardan en bajar sin caer. Se realizan cinco ensayos diarios y el tiempo por ensayo es limitado a 60 segundos. El tercer día se realiza el test y se toman los valores medios de los cinco ensayos de ese mismo día.



PROTOCOLO DE EUTANASIA Y OBTENCION DE MUESTRAS

El experimento duró siete meses, tras los cuales los animales fueron sacrificados mediante cámara de CO₂. Tras la eutanasia, extrajimos a cada ratón la máxima sangre posible, que fue centrifugada para separación de suero y fue congelado en diferentes alícuotas a -20°C hasta su utilización. Posteriormente, se procedió a la necropsia con la extracción de los siguientes órganos: ojos, corazón, riñones, hígado, páncreas.

Todos los órganos fueron fijados en formol neutro tamponado al 10% al menos durante 48 horas, incluidos en parafina, cortados a 4 µm de espesor y teñidos con Hematoxilina y eosina según el método habitual de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Murcia. Las muestras de riñón fueron también teñidas con la tinción de PAS (ácido peryódico de Schiff).

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL PÁNCREAS

Para evidenciar el porcentaje de islotes pancreáticos, realizamos 7 secciones histológicas seriadas de cada bloque devastando 20 μm entre una y otra, que fueron teñidas con Hematoxilina-eosina .

El porcentaje de islotes pancreáticos se calcula estimando el área de islotes pancreáticos referida a la sección completa multiplicado por 100.

Los 7 portas correspondientes a cada individuo se escanearon utilizando el equipo Leica SCN 400F (Leica, Microsystems, Wetzlar, Alemania). Este equipo escanea portas microscópicos a alta resolución, obteniendo imágenes a una magnificación máxima de 800x. Las imágenes se visualizaron utilizando la aplicación web Digital Image Hub (Slidepath, Leica microsystem, Wetzlar, Alemania). Esta aplicación nos permite acceder en remoto a las imágenes de alta resolución y obtener capturas de las áreas de interés.

Una vez obtenidas las imágenes a alta resolución obtuvimos dos tipos de capturas, por una parte la sección completa a una magnificación de 10x y otra de los islotes a una magnificación de 200x.

Las imágenes obtenidas a una magnificación de 10x se analizaron con el programa de análisis de imagen de libre distribución ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij).

EL protocolo se describe a continuación:

1. Primero se realizó un calibrado para determinar la equivalencia entre los pixeles de la imagen y las micras.
2. Posteriormente, las imágenes RGB se transforman a imágenes de 8Bits,
3. Las imágenes de 8Bits se segmentan automáticamente por niveles de gris para obtener una imagen binaria.
4. La imagen binaria es la imagen que usamos para calcular el área en μm^2 .

Este proceso se automatizó en una macro para asegurarnos el calibrado de las imágenes y la constancia en los niveles de gris utilizados.

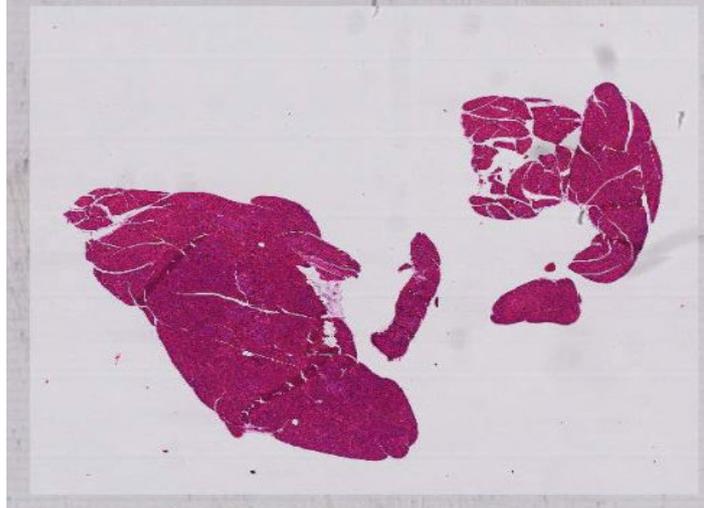


Figura 17. Imagen RGB.

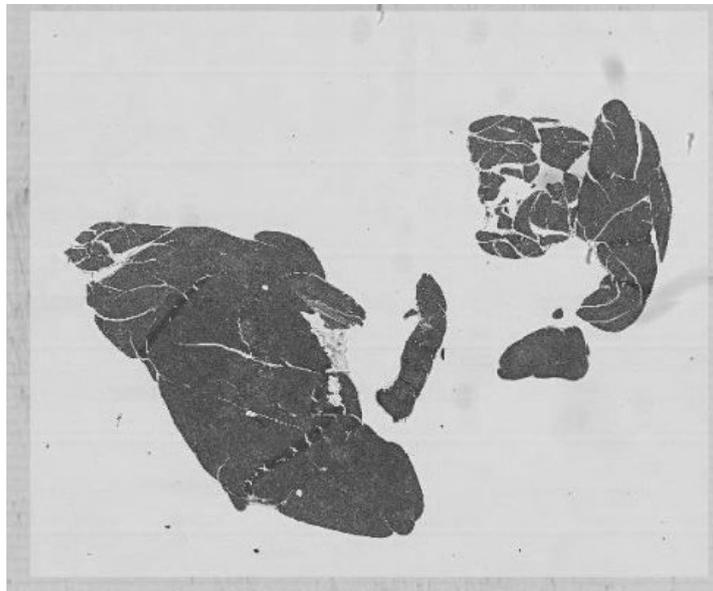


Figura 18. Imagen 8 Bits



Figura 19. Imagen binaria

Las imágenes a 200x se utilizaron para evaluar el área de los islotes, en este caso utilizando ImageJ se realizó un calibrado morfométrico como el descrito anteriormente y los islotes se seleccionaron de forma interactiva, esta selección se midió y nos devolvió un área en μm^2 .

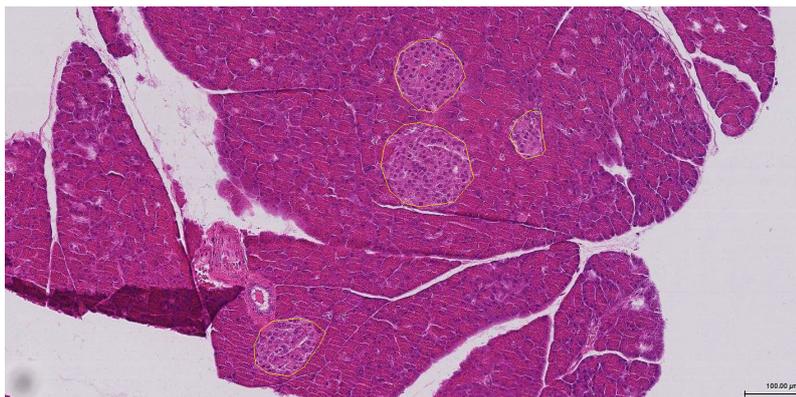


Figura 20. Programa para el recuento de islotes y cálculo de las áreas

Una vez obtenidas las imágenes se calcularon las áreas total y de los islotes y obtuvimos los resultados finales. La fórmula que se utilizo para obtener el porcentaje de los islotes fue la siguiente:

$$\frac{\sum_{n=1}^{n=i} (A_{\text{Islotes}} / A_{\text{Sección}}) \times 100}{n_i}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Analizamos los datos estadísticos con el paquete de software SPSS® versión 12.0 (SPSS® Inc, Chicago, USA) para Windows, en el cual hemos efectuado los siguientes procedimientos estadísticos:

En primer lugar, para el análisis descriptivo de la distribución general de la muestra, así como para el análisis de cada una de las variables (tanto en conjunto como para cada uno de los subgrupos), se han calculado los parámetros característicos: media, desviación típica y los valores máximos y mínimos (rango).

En segundo lugar, se realizó el análisis de varianza de una vía, complementado con contrastes de igualdad de pares de medias, con el método de la mínima diferencia significativa y con la corrección de Bonferroni.

V. RESULTADOS

I. VARIACIONES MORFOLÓGICAS

Peso e Índice de conversión:

Peso corporal:

GRUPO	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7
CONTROL	28,59 ± 1,83	38,72 ± 2,96	46,21 ± 4,39	48,23 ± 4,58	49,64 ± 4,01	49,37 ± 5,69	46,50 ± 6,69
E. FRESNO	28,69 ± 2,00	41,62 ± 2,20	48,71 ± 4,54	48,03 ± 6,52	48,09 ± 7,98	46,04 ± 9,06	41,82 ± 8,63
E. SPERGULARIA	28,90 ± 1,44	41,05 ± 3,72	44,44 ± 5,55	41,62 ± 6,34	41,41 ± 6,34	40,60 ± 6,73	37,18 ± 6,40
E. GRANADA	32,78 ± 1,76	46,95 ± 2,44	49,81 ± 3,71	48,52 ± 5,01	46,84 ± 4,48	43,80 ± 4,34	40,82 ± 4,16

Tabla 2. Peso medio y desviación típica de todos los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Al comienzo del tratamiento los animales del grupo E. granada presentaban un mayor peso corporal existiendo diferenciación significativa ($p < 0,05$) (Figura 21 A).

Como podemos observar en la Figura 21 A, los animales a los que se les administró E. fresno no presentaron diferencias significativas frente al grupo control respecto a la evolución del peso corporal.

Como podemos ver en la Figura 21 B los animales a los que se les administró E. spergualria presentaron una disminución en la evolución del peso corporal siendo significativa ($p < 0,05$) a partir del cuarto mes del experimento.

Como vemos en la Figura 21 C, los animales tratados con E. granada también sufrieron una disminución del peso corporal a partir del quinto-sexto mes del experimento no habiendo diferencias significativas.

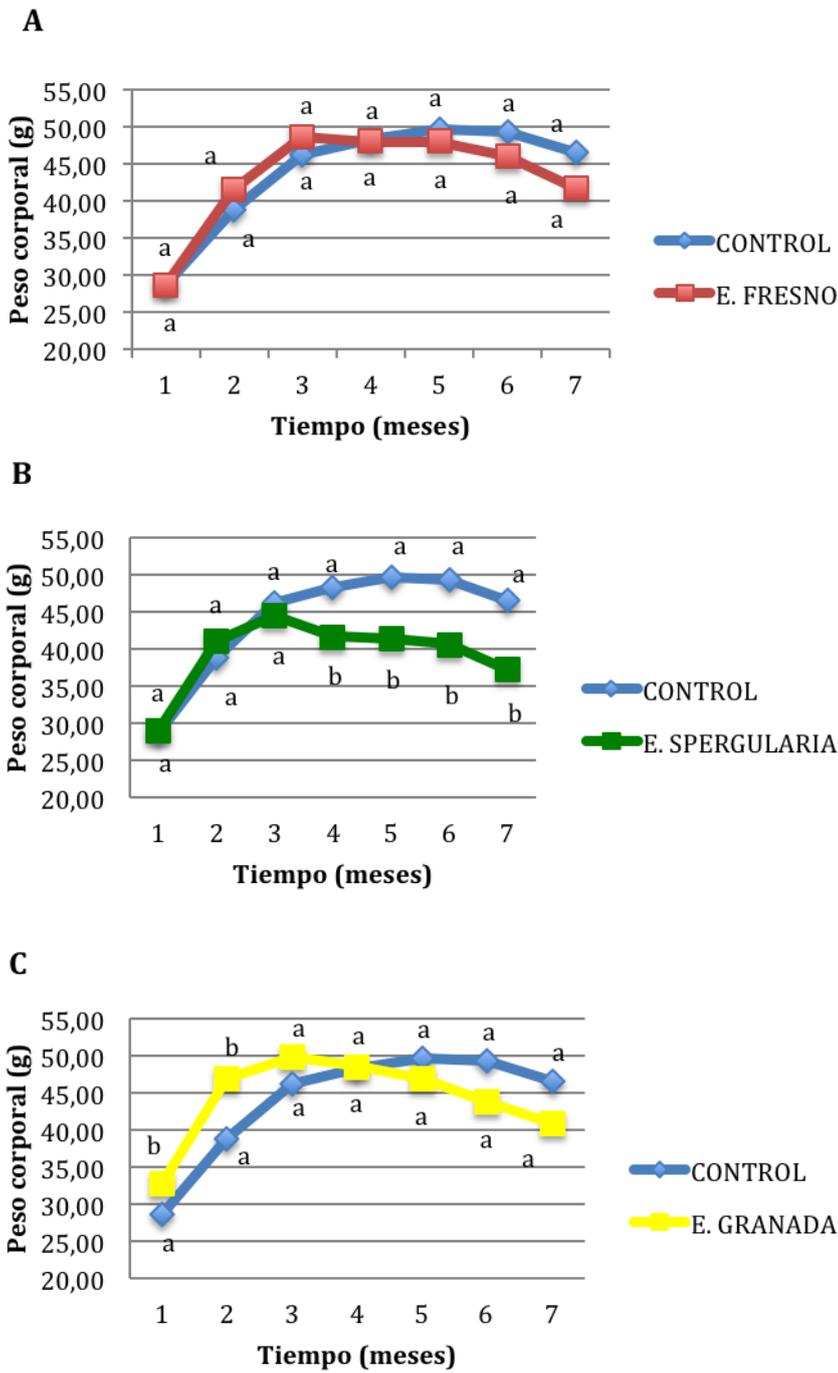


Figura 21. Evolución del peso corporal de los animales del grupo control y de los grupos tratados que recibieron tratamiento con E. fresno (A), E.spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10). Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa ($p < 0,05$).

Índice de conversión:

GRUPO	INGESTA MEDIA (g/ratón/día)						
	1	2	3	4	5	6	7
TIEMPO (meses)							
CONTROL	5,37	5,47	5,33	5,64	4,8	4,19	4,18
E. FRESNO	7,05	7,44	7,56	6,63	7,39	6,82	6,79
E. SPERGULARIA	8,77	8,29	7,61	7,53	7,27	7,12	6,58
E. GRANADA	7,27	8,16	7,4	7,38	7,55	6,99	6,32
CITROLIVE ORAL	5,33	5,28	5,19	5,04	5,09	5,52	5,53
CITROLIVE SUBCUTÁNEO	5,37	5,28	5,19	5,6	5,09	6,22	6,23

Tabla 3. Ingesta media de comida en los grupos control y de tratamiento durante los 7 meses de duración del experimento. Los valores están expresados como media (n = 7-10).

El grupo tratado con E. fresno ganó menos peso que el grupo control a partir del cuarto mes (Figura 21 A). A pesar de comer más (Tabla 3), engordaron proporcionalmente menos, esto se ve reflejado en el menor índice de conversión alimenticio en el grupo de E. fresno ($p < 0,05$), (Figura 22 A).

Los animales tratados con E.spergularia ganaron menos peso que los del grupo control a partir del tercer mes, con una ingesta media de pienso diario menor respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Tabla 3). Engordaron proporcionalmente menos, con un índice de conversión alimenticio significativamente inferior en el grupo de E.spergularia, donde se apreciaron diferencias significativas a lo largo de todo el experimento ($p < 0,05$), (Figura 22 B).

Se observó cómo el grupo tratado con E. granada presentó un peso significativamente superior al principio del experimento (Figura 21 C), pero a partir del cuarto mes, los animales ganaron menos peso que el grupo control, presentando una hiperfagia significativamente mayor como se ve en la tabla 3, lo que se ve reflejado en el menor índice de conversión alimenticio en el grupo del E. granada, donde se apreciaron diferencias significativas a lo largo de todo el experimento ($p < 0,05$), (Figura 22 C).

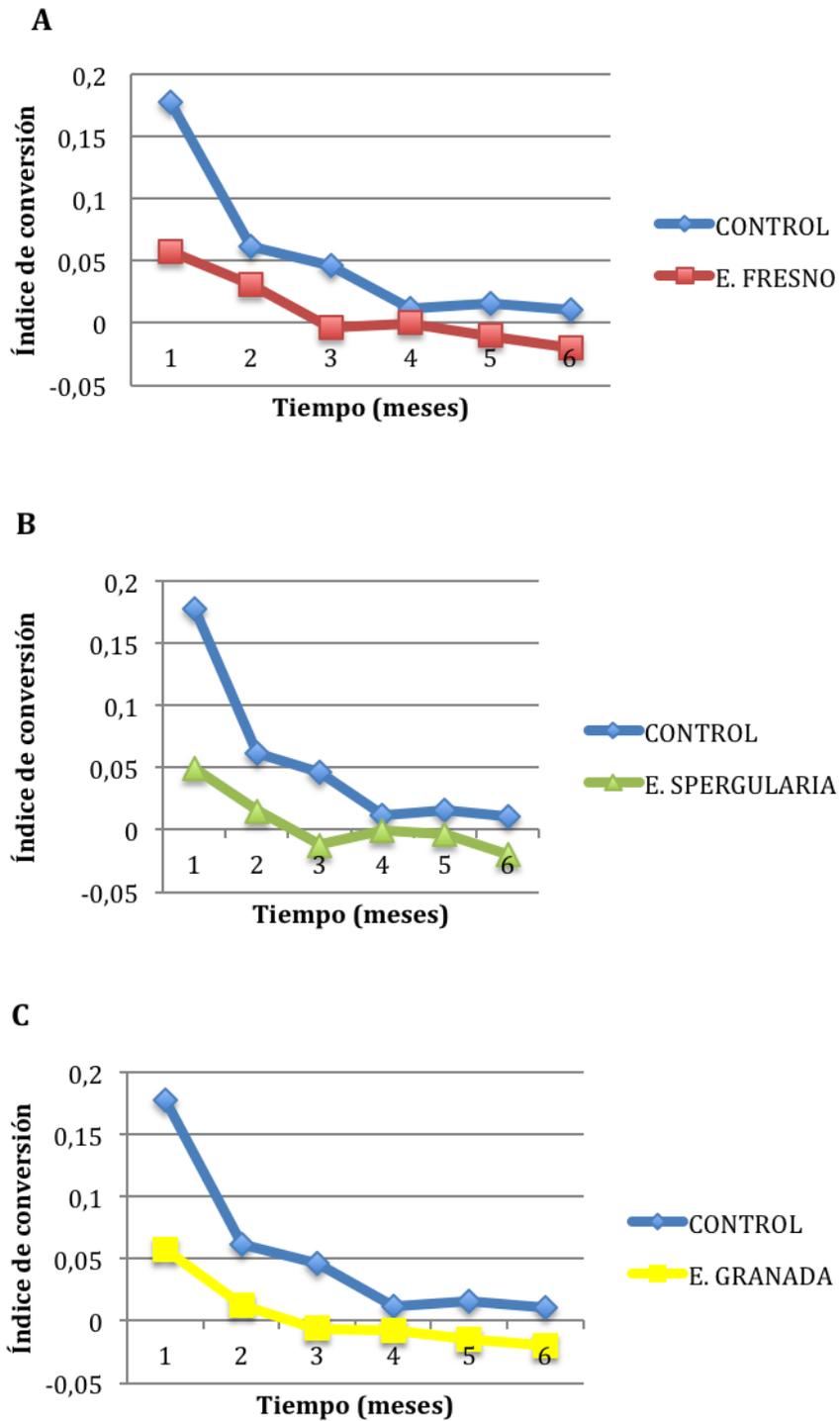


Figura 22. Índice de conversión alimenticio del grupo E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10).

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS CON LA GLUCEMIA

Glucosa:

GRUPO	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7
CONTROL	252,20 ±50,48	409,10 ± 108,58	448,00 ± 155,00	501,40 ± 111,32	660,70 ± 249,57	695,70 ± 196,16	791,25 ± 140,44
E. FRESNO	301,70 ± 60,68	455,10 ± 101,96	544,20 ± 49,86	576,30 ± 57,68	797,83 ± 168,23	726,31 ± 119,58	506,00 ± 82,97
E. SPERGULARIA	349,10 ± 70,01	542,20 ± 64,83	580,80 ± 33,07	590,50 ± 29,00	934,22 ± 149,59	1001,50 ± 210,44	689,56 ± 162,44
E. GRANADA	399,80 ± 55,75	512,50 ± 60,38	567,30 ± 32,39	594,33 ± 14,14	796,43 ± 138,99	908,43 ± 65,84	616,25 ± 92,20

Tabla 4. Media y desviación típica de los niveles de glucemia de todos los grupos durante los 7 meses de duración del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Como podemos ver en la Figura 23 A, tanto el grupo control como el grupo tratado con E. fresno al comienzo del experimento y hasta el mes cuatro sufren un aumento lineal de los niveles de glucemia, sin existir ninguna diferencia significativa. A partir del quinto mes vemos que hay una mayor diferencia entre los niveles de glucemia entre ambos grupos, siendo mayores los niveles de glucemia del grupo control frente al grupo E. fresno, con diferencia significativa en el sexto mes ($p < 0,05$).

Los animales tratados con E. spergularia desde el comienzo del experimento han obtenido valores superiores de los niveles de glucemia frente a los animales del grupo control, por lo que aun existiendo diferencias significativas entre ambos grupos dichas diferencias son favorables para el grupo control (Figura 23 B).

A lo largo del estudio tanto el grupo control como el grupo E. granada muestran un aumento progresivo y lineal de los niveles de glucemia, exceptuado en el sexto mes en el que se ve una disminución de los niveles de glucemia del grupo E. granada respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Figura 23 C).

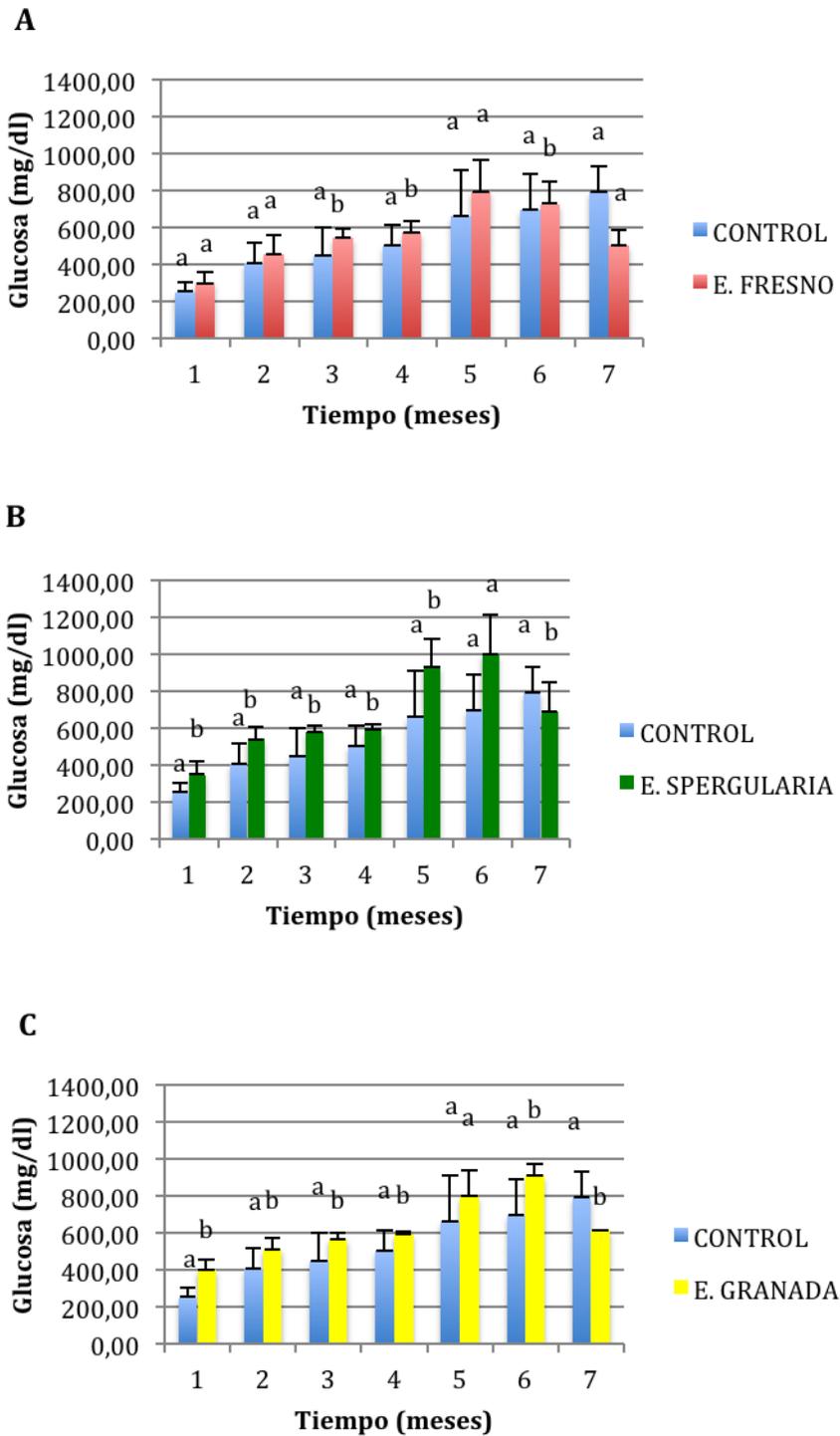


Figura 23. Concentración de glucosa capilar de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (B). Los valores están expresados como media aritmética (n = 7-10) ± DE. Los valores para un mismo tiempo con distinta letra, presentan diferencia significativa (p< 0,05).

Insulina:

GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO
CONTROL	5,60	0,82	0,23
E. FRESNO	4,39	1,50	0,53
E. SPERGULARIA	4,60	1,03	0,34
E. GRANADA	5,14	0,87	0,31

Tabla 5. Media y desviación típica de los niveles de insulina de todos los grupos en el 7º mes del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Todos los animales de los grupos tratados presentaron unos niveles inferiores de insulina respecto a los animales del grupo control, pero los únicos que presentan diferencias significativas respecto del grupo control son los animales tratados con E. fresno ($p < 0,05$) y los animales tratados con E. spergularia ($p < 0,05$) (Figura 24 A y B).

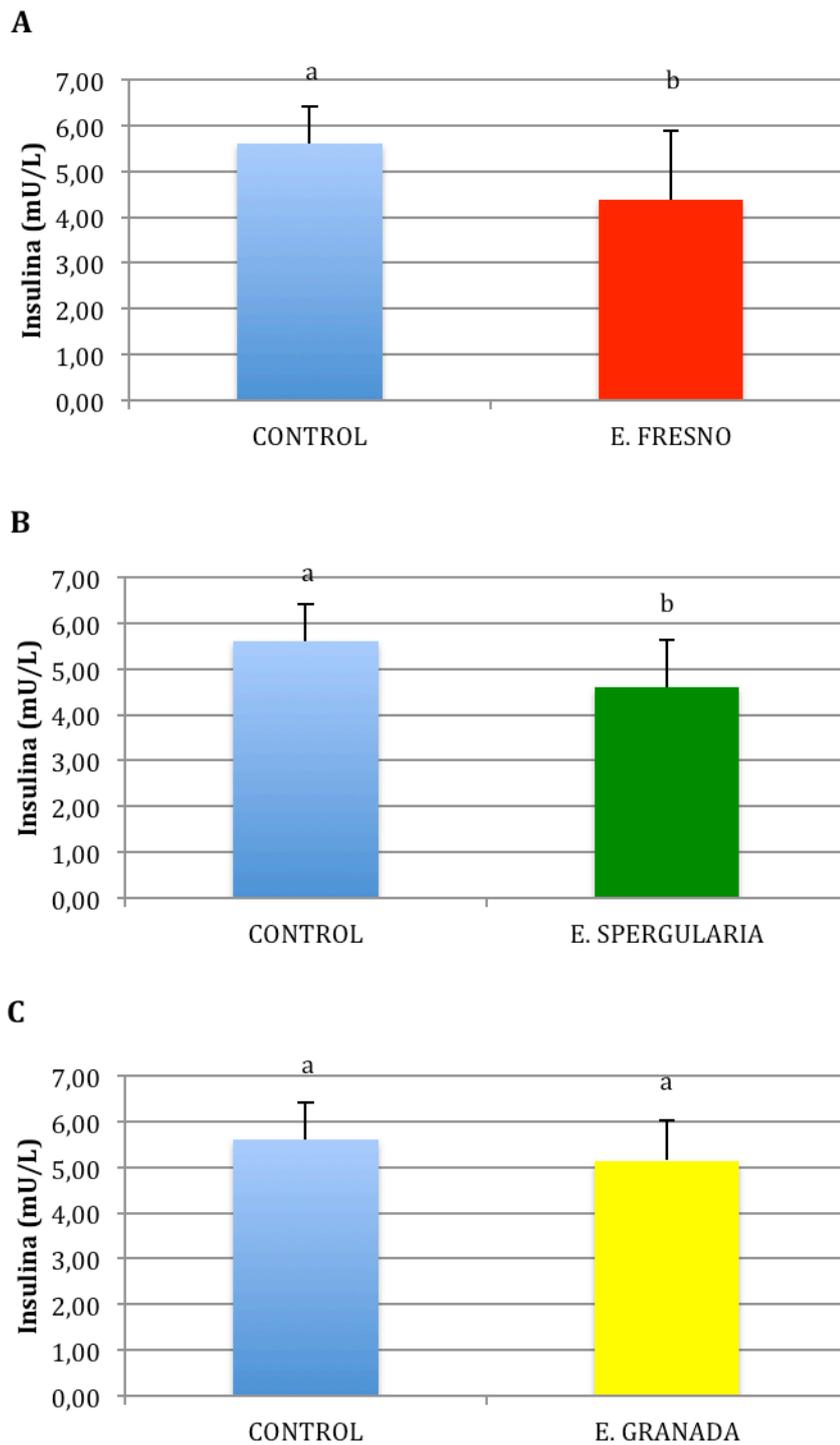


Figura 24. Concentración plasmática de insulina de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

HOMAR-IR:

GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO
CONTROL	9,55	1,33	0,54
E. FRESNO	5,36	2,53	0,90
E. SPERGULARIA	7,87	3,03	1,01
E. GRANADA	7,88	2,05	0,73

Tabla 6. Media, desviación típica y error típico del parámetro Homar-ir de todos los grupos al finalizar el experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Todos los animales a los que se les había administrado los diferentes tratamiento han obtenido unos niveles inferiores a los animales del grupo control, siendo los valores del grupo E. fresno los que presentan diferencia significativa ($p < 0,05$) (Figura 25 A), respecto a los del grupo control.

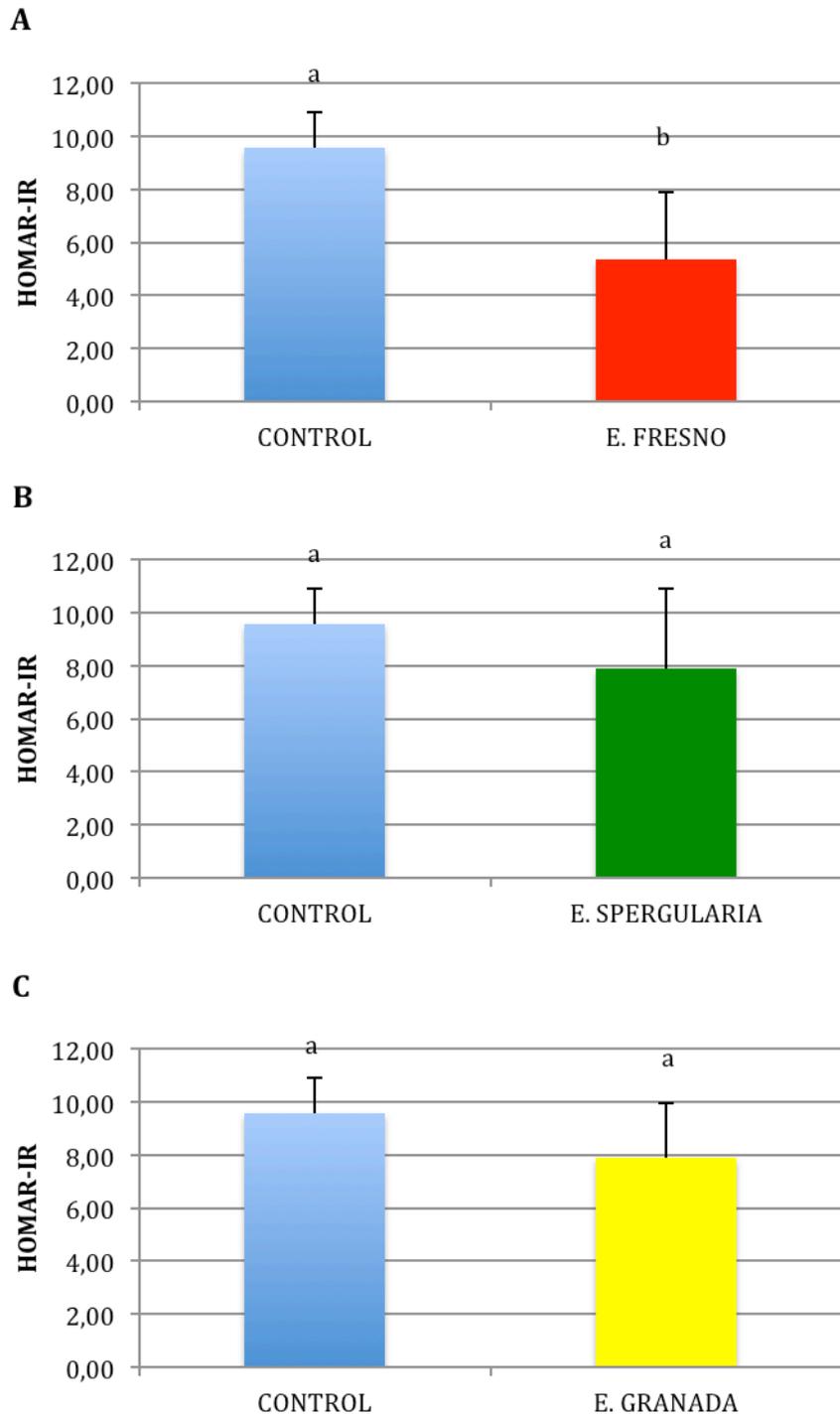


Figura 25. Concentración plasmática del parámetro Homar-ir de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Hemoglobina glicosilada (HbAC1):

GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR TÍPICO
CONTROL	6,71	1,51	0,48
E. FRESNO	5,93	0,84	0,30
E. SPERGULARIA	8,09	1,17	0,39
E. GRANADA	7,35	0,71	0,25

Tabla 7. Media, desviación típica y error típico de la hemoglobina glicosilada de todos los grupos al finalizar el experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

El único grupo de animales que obtiene unos niveles inferiores de hemoglobina glicosilada es el grupo tratado con E. fresno, sin existir una diferencia significativa (Figura 26 A).

En la Figura 26 B, podemos ver que existe diferencia significativa en el grupo E. spergularia ($p < 0,05$), siendo dicha diferencia favorable para el grupo control.

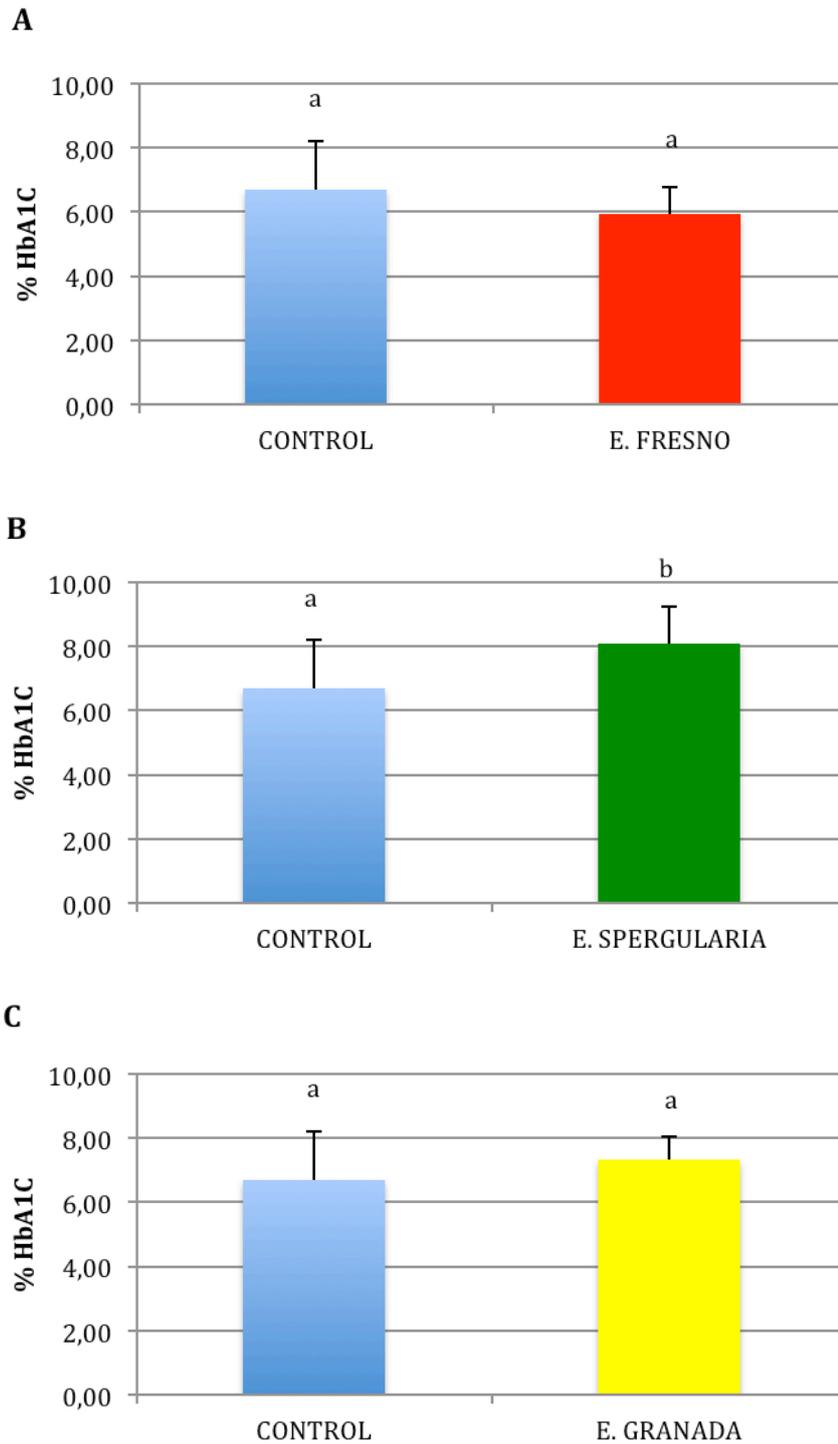


Figura 26. Medida de la Hemoglobina glicosilada en los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS GENERALES

TNF- α (Factor de necrosis tumoral):

GRUPO	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	10,13 \pm 1,96	14,60 \pm 5,75	17,12 \pm 7,96
E. FRESNO	10,36 \pm 1,61	11,49 \pm 3,82	13,08 \pm 6,06
E. SPERGULARIA	10,50 \pm 1,43	11,09 \pm 4,48	14,64 \pm 5,36
E. GRANADA	12,02 \pm 2,94	14,13 \pm 7,70	10,38 \pm 5,08

Tabla 8. Media y desviación típica del TNF- α del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

En los niveles de factor de necrosis tumoral (TNF- α), no se aprecia una deducción en ningún grupo. Como podemos ver en la Figura 27 A y B tanto el grupo control como los animales tratados con E. fresno y E. spergularia aumentan de forma lineal los niveles plasmáticos de TNF- α , siendo mayor los valores del grupo control que los de los grupos tratados al final del experimento.

En la Figura 27 C podemos ver que los animales tratados con E. granada presentan valores inferiores respecto al grupo control a partir del quinto mes del experimento, siendo mucho menor los niveles de TNF- α del grupo E. granada en el séptimo mes, así mismo dicha disminución no presenta diferencia significativas.

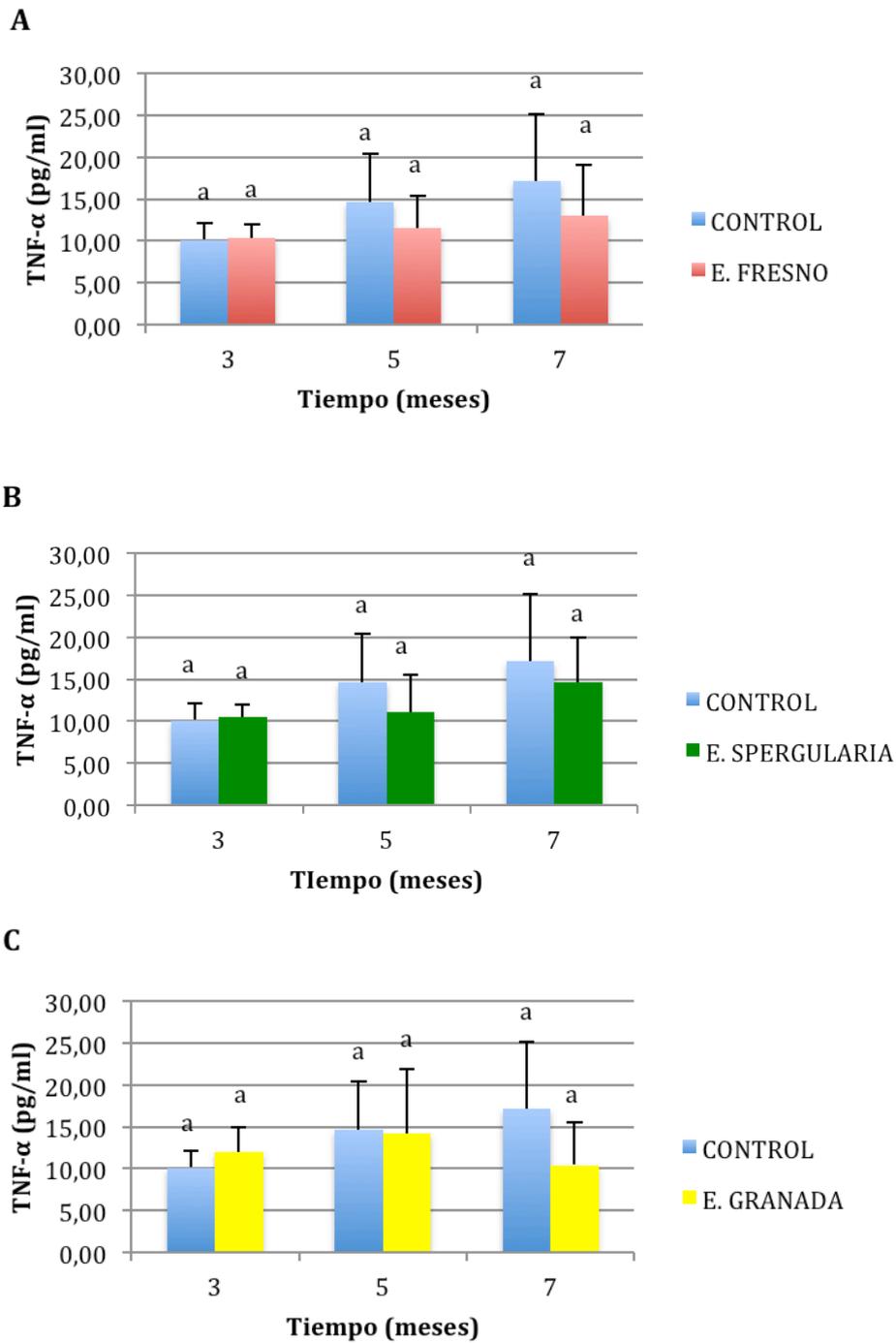


Figura 27. Niveles plasmáticos de factor de necrosis tumoral (TNF- α) de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados con media (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Adiponectina:

GRUPO	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	10,50 ± 2,90	9,15 ± 2,84	10,68 ± 1,82
E. FRESNO	10,20 ± 2,71	9,44 ± 4,16	13,15 ± 3,60
E. SPERGULARIA	10,61 ± 3,00	9,60 ± 3,30	14,76 ± 1,90
E. FRESNO	10,00 ± 2,68	9,64 ± 2,66	13,84 ± 2,30

Tabla 9. Media y desviación típica de los niveles de adiponectina del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Tanto el grupo E. fresno como el grupo E. spergularia como el grupo Pomegranate presentan niveles superiores de adiponectina al final del experimento con respecto al grupo control, donde el peso de los ratones es menor (Figuras 28 A, B y C). Dichas diferencias son significativas tanto en el grupo E. spergularia y el grupo e. granada ($p < 0,05$).

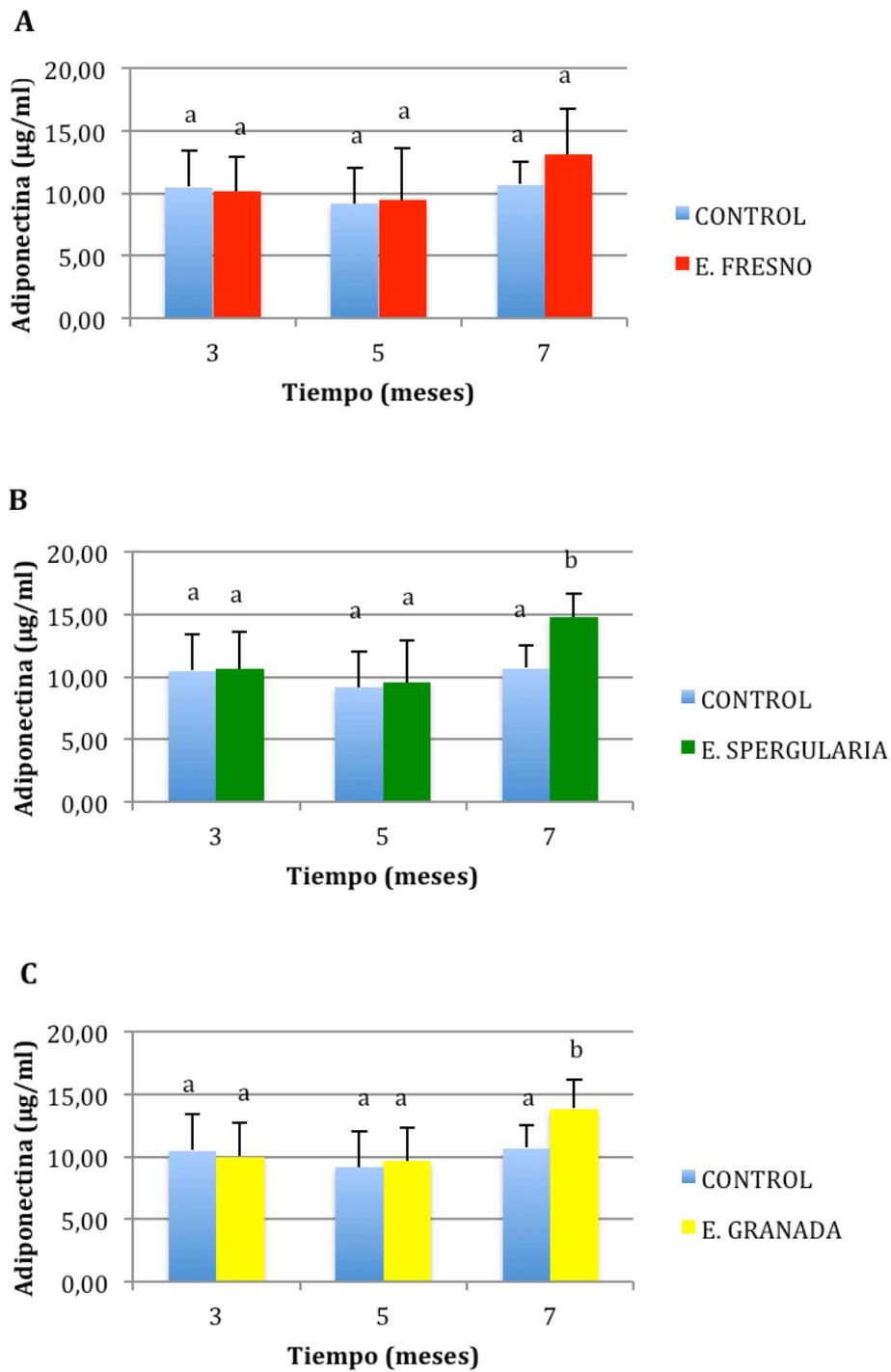


Figura 28. Niveles plasmáticos de adiponectina de los E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Albúmina:

	ALBÚMINA ($2,99 \pm 0,659$ g/dL)*		
GRUPO	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	$4,68 \pm 0,15$	$4,68 \pm 0,32$	$4,66 \pm 0,39$
E. FRESNO	$4,73 \pm 0,21$	$4,59 \pm 0,30$	$4,73 \pm 0,28$
E. SPERGULARIA	$4,73 \pm 0,23$	$4,63 \pm 0,25$	$4,76 \pm 0,21$
E. GRANADA	$3,93 \pm 1,54$	$4,58 \pm 0,38$	$4,56 \pm 0,23$

Tabla 10. Media y desviación típica de los niveles de albúmina del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie

Como podemos ver en la Figura 29 A, los niveles plasmáticos de albúmina del grupo E. fresno son mayores en el primer mes y en el último respecto al grupo control, no existiendo diferencia significativa en ninguno de los resultados.

Los animales tratados con E. spergularia, al igual que los tratados con E. fresno, tienen mayores niveles plasmáticos de albúmina en el primer y último mes respecto al grupo control. Dicha variación en los niveles de albúmina no posee diferencia significativa (Figura 29 B).

Como podemos ver en la Figura 29 C, tanto los niveles de albúmina plasmática del grupo control como los del grupo E. granada se mantienen más o menos constantes durante todo el experimento, exceptuando en el primer mes donde los niveles de albúmina del grupo control son mayores que los del grupo E. granada, siendo dicha diferencia significativa ($p < 0,05$).

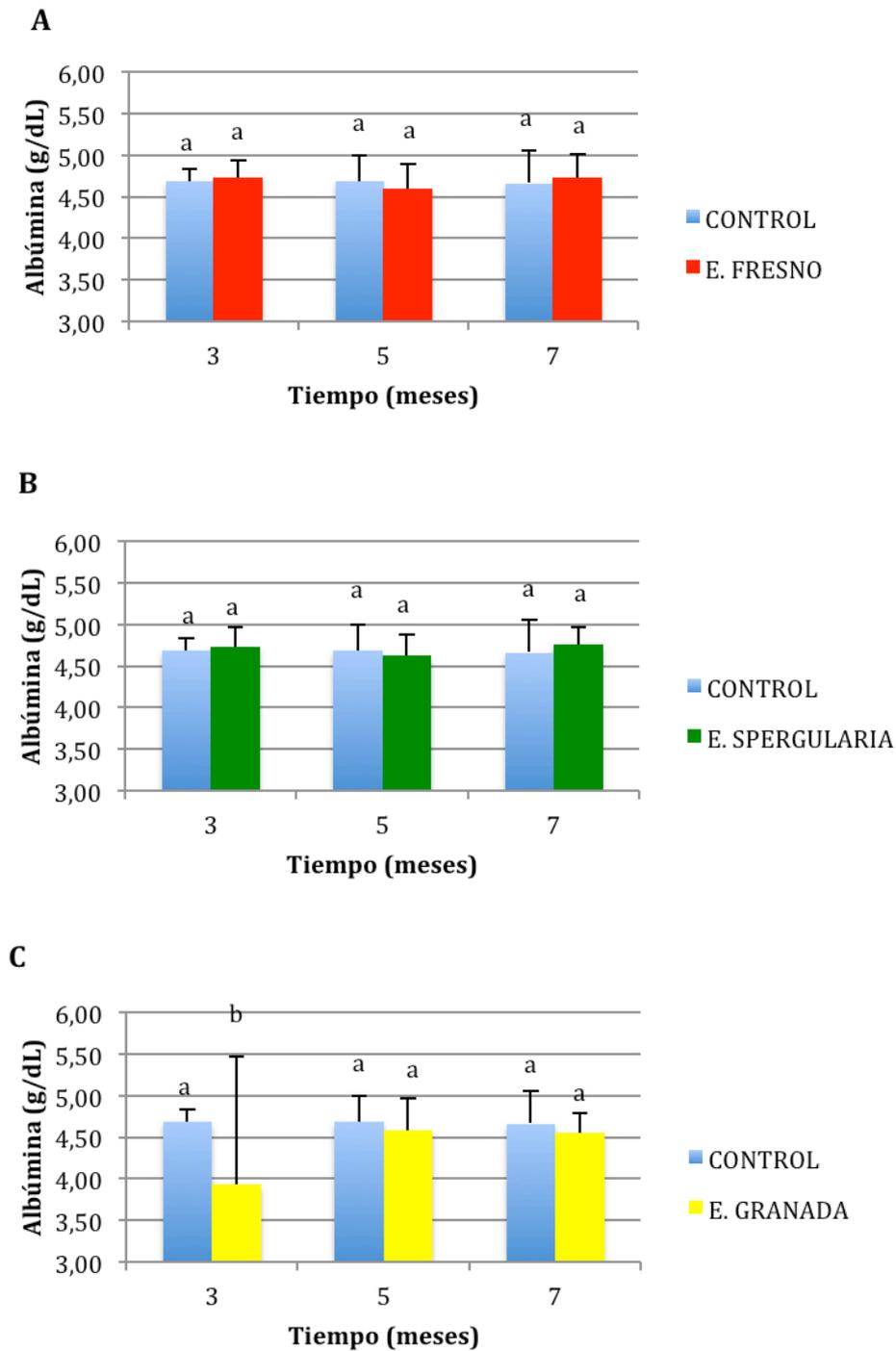


Figura 29. Niveles plasmáticos de albúmina de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Fosfatasa alcalina:

GRUPO	FOSFATASA ALCALINA (158 ± 44,6 U/L)*		
	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	134,2 ± 29,07	100,10 ± 38,52	91,75 ± 29,49
E. FRESNO	165 ± 20,51	95,57 ± 16,30	101,13 ± 17,75
E. SPERGULARIA	158,33 ± 34,03	95,56 ± 12,51	94,44 ± 14,40
E. GRANADA	95,33 ± 42,51	107,00 ± 19,25	89,50 ± 22,11

Tabla 11. Media y desviación típica de los niveles de fosfatasa alcalina del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie

Los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina de los animales tratados con E. fresno no presentan diferencias significativas respecto al grupo control. Si podemos ver en la Figura 30 A que a los tres meses de tratamiento los niveles de fosfatasa alcalina del grupo tratado con E. fresno obtuvo valores superiores respecto al grupo control. Esto mismo ocurre con los animales tratados con E. spergularia (Figura 30 B).

Como podemos ver Figura 30 C, en el tercer mes de tratamiento con E. granada los niveles de fosfatasa alcalina plasmáticos fueron mayores para el grupo control, siendo esta diferencia significativa ($p < 0,05$).

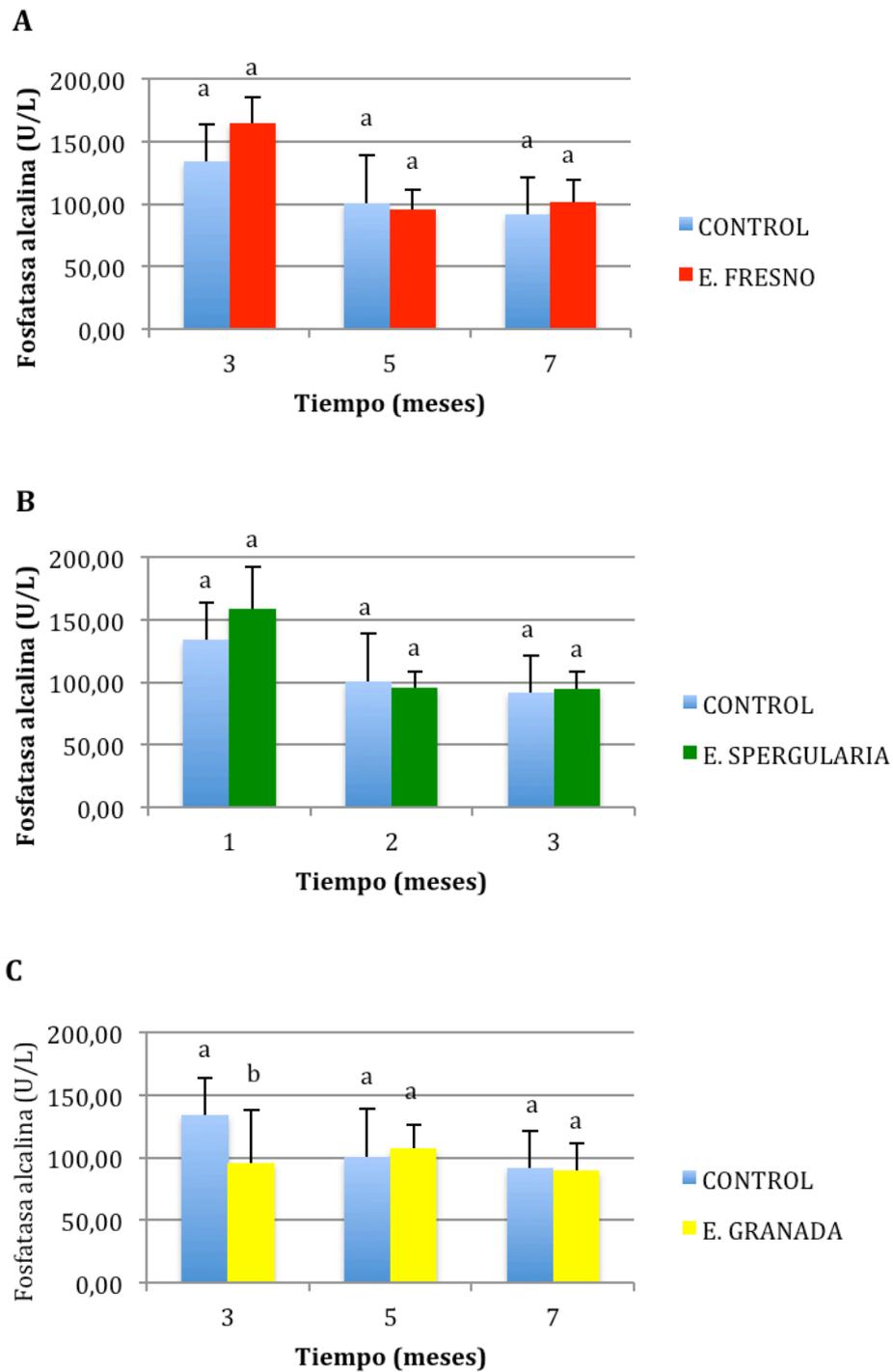


Figura 30. Niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Alanina aminotransferasa:

	ALANINA AMINOTRANSFERASA (407 ± 110 U/L)*		
GRUPO	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	123,80 ± 36,50	131,30 ± 40,01	107,00 ± 36,32
E. FRESNO	119,75 ± 40,22	124,43 ± 57,16	97,88 ± 47,48
E. SPERGULARIA	132,50 ± 25,56	127,11 ± 85,53	97,89 ± 17,11
E. GRANADA	90,17 ± 27,97	144,63 ± 67,91	101,63 ± 40,29

Tabla 12. Media y desviación típica de los niveles de alanina aminotransferasa del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

*Rango de normalidad para la especie

Para los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa no se apreciaron diferencias significativas entre el grupo control y los animales tratados con los diferentes tratamientos.

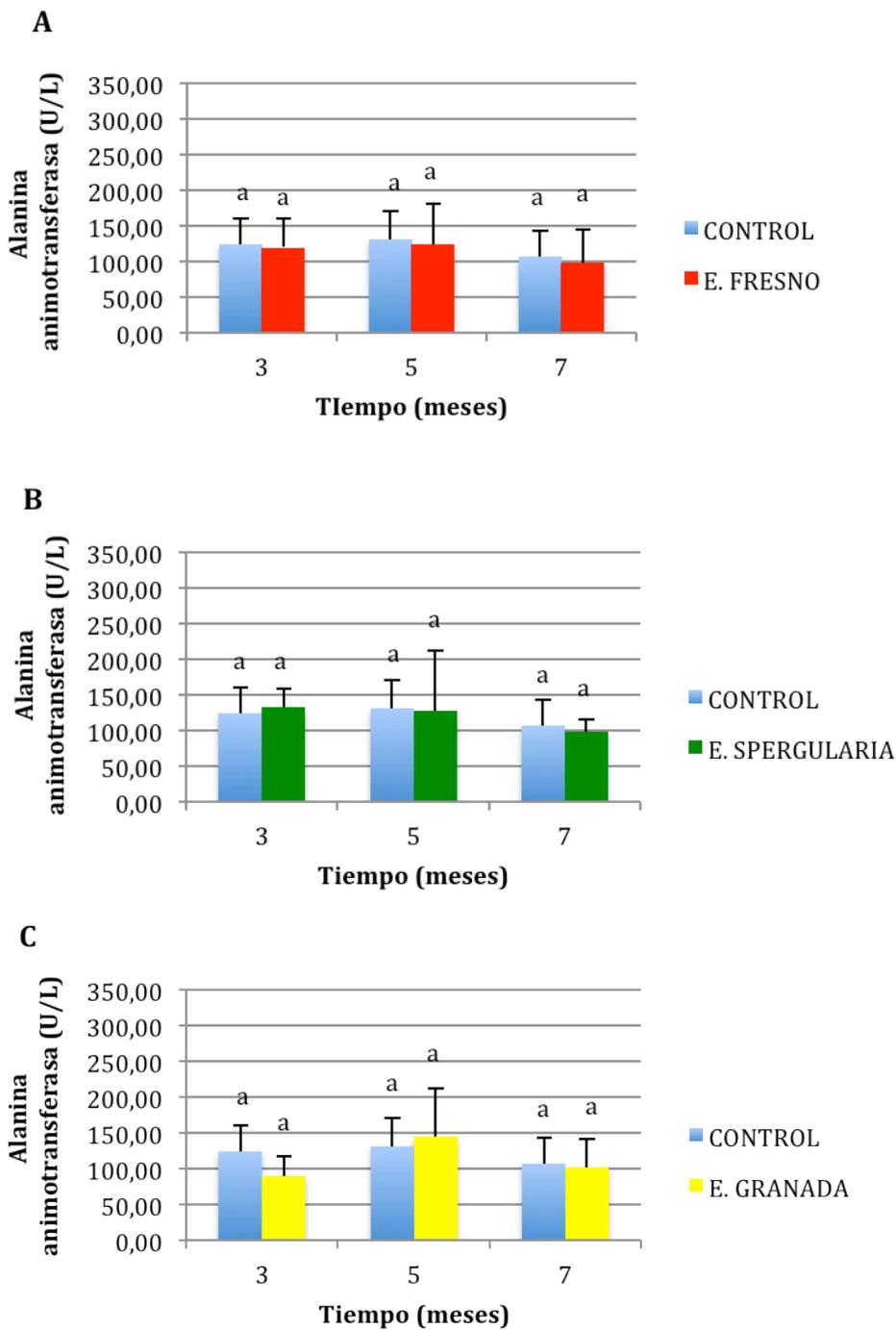


Figura 31. Niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

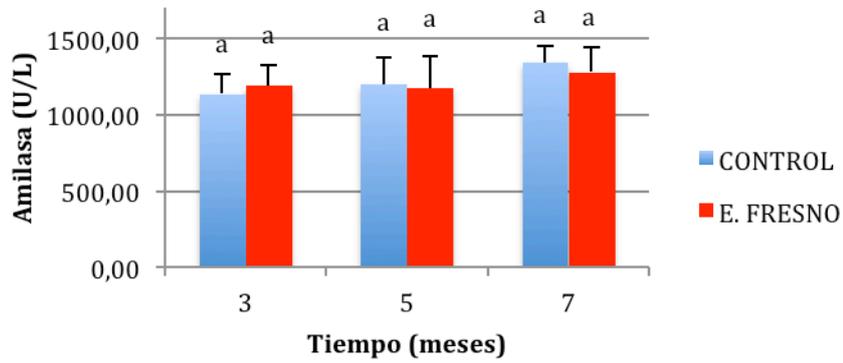
Amilasa:

GRUPO	AMILASA (1949 ± 1683 U/L)*		
	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	1134,00 ± 129,24	1196,40 ± 173,44	1336,13 ± 115,97
E. FRESNO	1186,50 ± 133,79	1169,43 ± 212,23	1276,88 ± 161,56
E. SPERGULARIA	1119,17 ± 146,21	1216,11 ± 149,58	1377,33 ± 94,36
E. GRANADA	911,17 ± 319,85	1272,50 ± 154,77	1391,75 ± 170,30

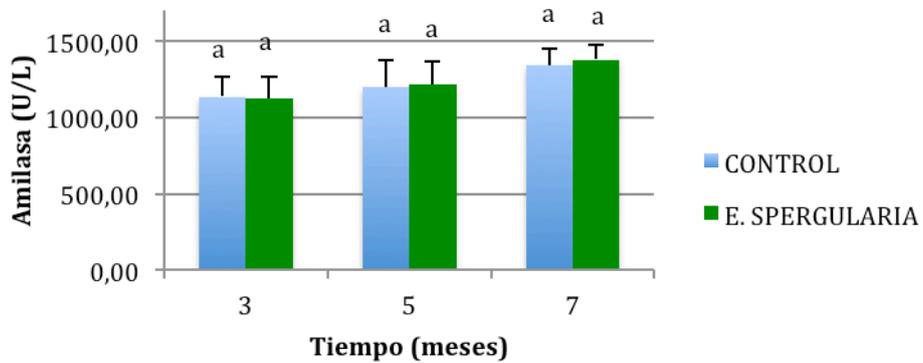
Tabla 13. Media y desviación típica de los niveles de amilasa del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie

No existen diferencias significativas entre el grupo control y los grupos a los cuales se les ha administrado tratamiento respecto a los niveles plasmáticos de amilasa. Únicamente se aprecia diferencia significativa ($p < 0,05$) en el tercer mes entre el grupo control y los animales tratados con E. granada, siendo mayor el nivel de amilasa plasmática del grupo control (Figura 32 A).

A



B



C

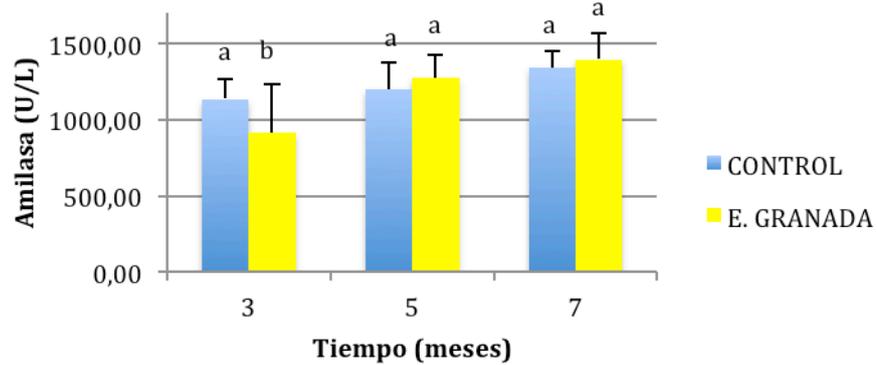


Figura 32. Niveles plasmáticos de amilasa de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Urea nitrógeno:

GRUPO	UREA NITRÓGENO (22,7 ± 4,99 mg/dL)*		
	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	21,60 ± 1,43	21,80 ± 3,26	19,25 ± 2,82
E. FRESNO	22,50 ± 3,00	23,14 ± 3,76	18,75 ± 3,69
E. SPERGULARIA	21,67 ± 2,07	24,78 ± 6,00	20,22 ± 4,09
E. GRANADA	18,67 ± 7,79	22,13 ± 4,91	18,25 ± 3,20
CITROLIVE ORAL	23,80 ± 2,39	15,33 ± 3,39	19,00 ± 2,90
CITROLIVE SUBCUTÁNEO	17,33 ± 2,40	18,63 ± 4,47	20,20 ± 5,54

Tabla 14. Media y desviación típica de los niveles de urea nitrógeno del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie.

No existen diferencias significativas para los niveles plasmático de urea nitrógeno entre el grupo control y los animales a los que se les administró los diferentes tratamientos.

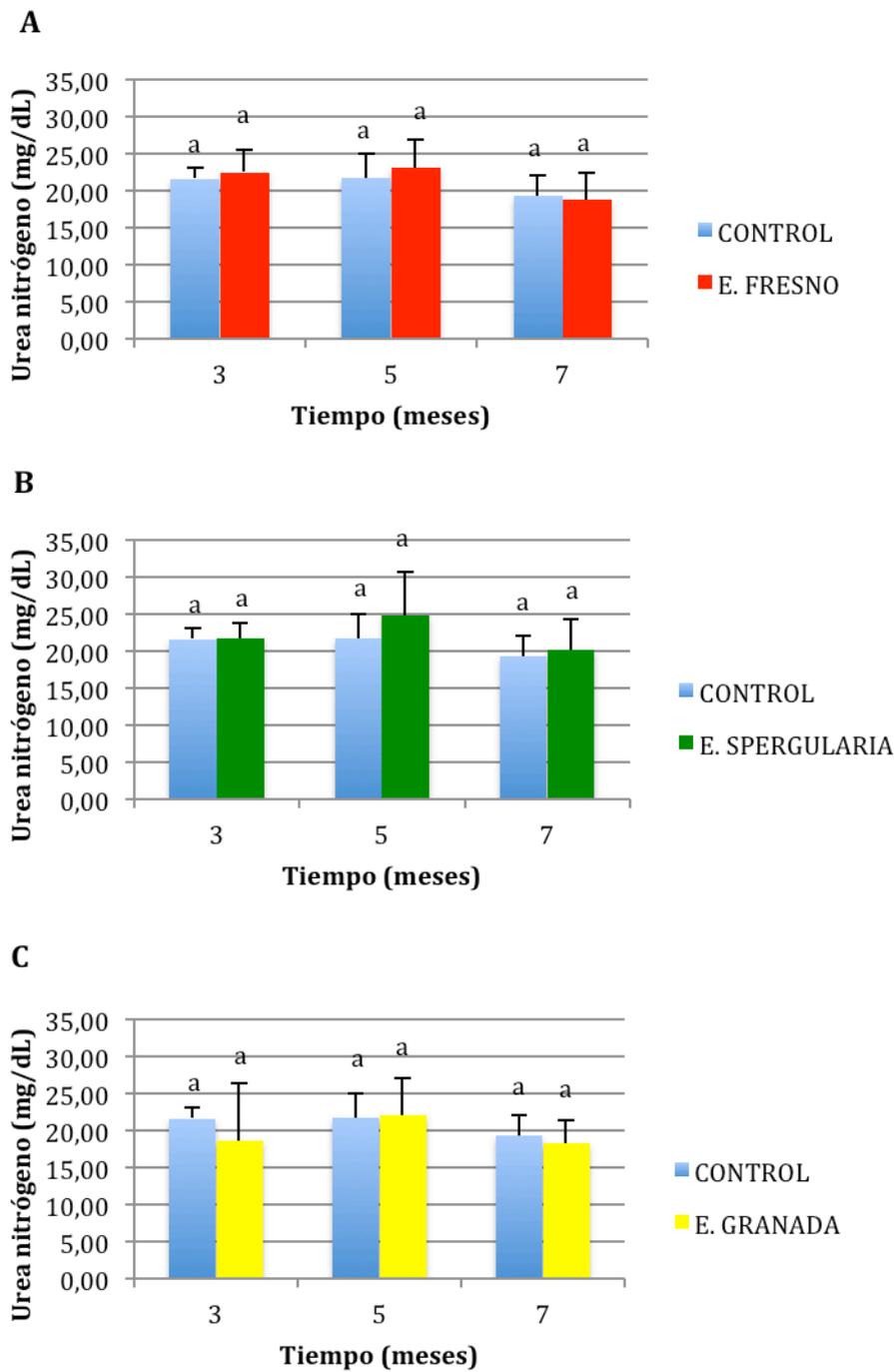


Figura 33. Niveles plasmáticos de urea nitrógeno de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Globulina:

GRUPO	GLOBULINA (18-82 g/L)*		
	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	1,88 ± 0,30	1,92 ± 0,26	2,24 ± 0,30
E. FRESNO	1,95 ± 0,25	2,13 ± 0,21	2,14 ± 0,39
E. SPERGULARIA	2,10 ± 0,21	2,01 ± 0,14	2,17 ± 0,19
E. GRANADA	1,60 ± 0,81	1,84 ± 0,19	2,23 ± 0,29

Tabla 15. Media y desviación típica de los niveles de globulina del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie.

Aunque podamos ver variaciones en los valores plasmáticos de globulina entre el grupo control y los grupos a los que se les administró tratamiento, no se aprecian diferencias significativas en ningún caso.

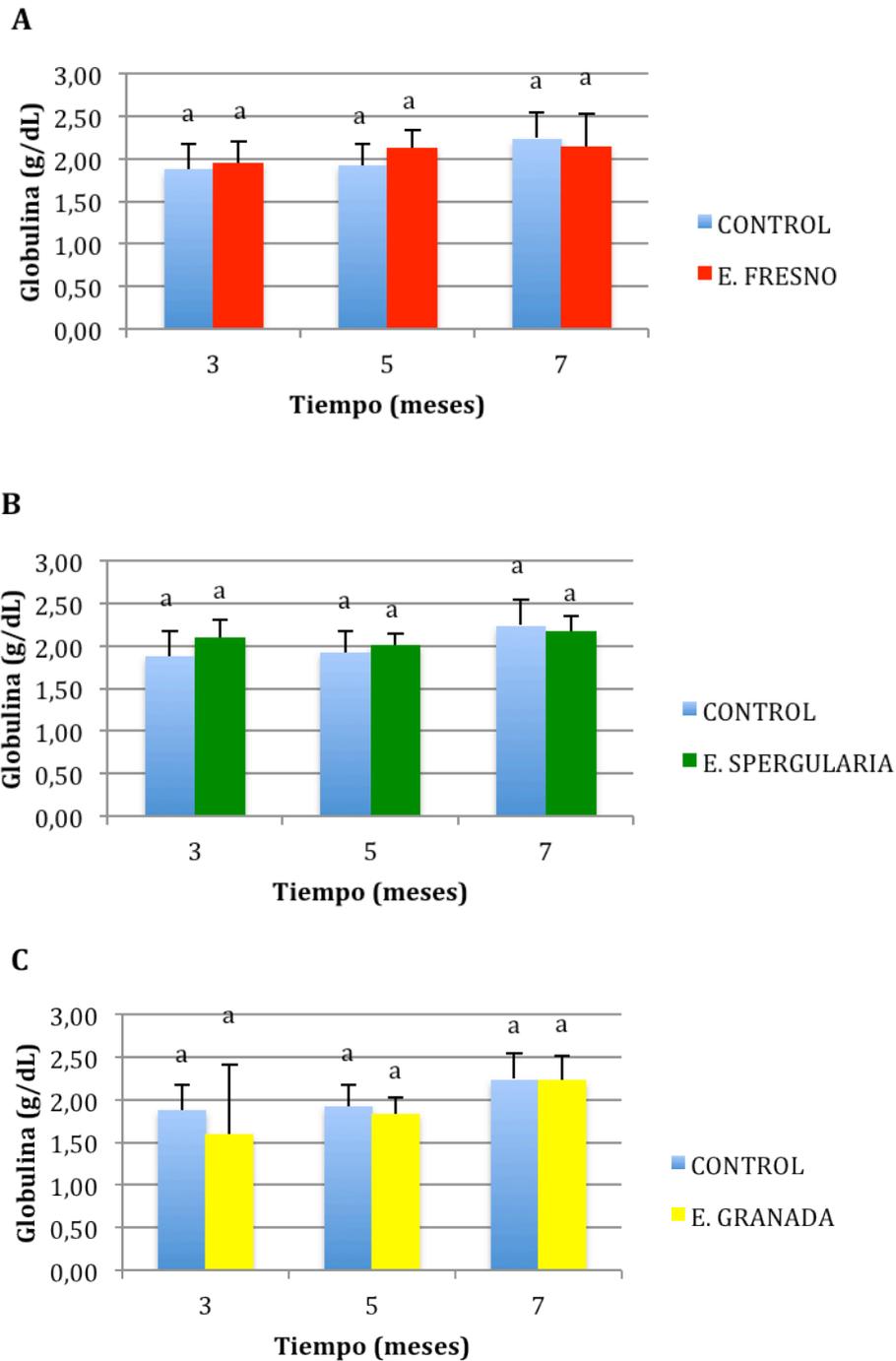


Figura 34. Niveles plasmáticos de globulina de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Bilirrubina total:

	BILIRRUBINA TOTAL (1,51 ± 0,953 md/dL)*		
GRUPO	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	0,28 ± 0,04	0,26 ± 0,05	0,25 ± 0,11
E. FRESNO	0,28 ± 0,05	0,26 ± 0,05	0,39 ± 0,04
E. SPERGULARIA	0,25 ± 0,05	0,30 ± 0,00	0,37 ± 0,05
E. GRANADA	0,30 ± 0,00	0,31 ± 0,06	0,35 ± 0,05

Tabla 16. Media y desviación típica de los niveles de bilirrubina total del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie.

En la Figura 35 A vemos que tanto los niveles plasmáticos de bilirrubina total del grupo control como los del grupo de animales tratados con E. fresno tanto en el mes tres como en el cinco presentan valores similares, en cambio en el séptimo mes se produce un incremento significativo ($p < 0,05$) de los niveles plasmáticos de bilirrubina total del grupo tratado con E. fresno.

En el grupo tratado con E. spergularia pasa lo mismo que en el anterior caso, existe alguna pequeña variación en los niveles plasmáticos de bilirrubina total frente al grupo control existiendo únicamente diferencia significativa ($p < 0,05$) en el séptimo mes (Figura 35 B).

Los animales tratados con E. granada vemos que a lo largo del experimento hay variaciones entre los niveles plasmáticos de bilirrubina total frente al grupo control, apareciendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el séptimo mes del experimento, siendo los valores del grupo E. granada mayores que los del grupo control (Figuras 35 C).

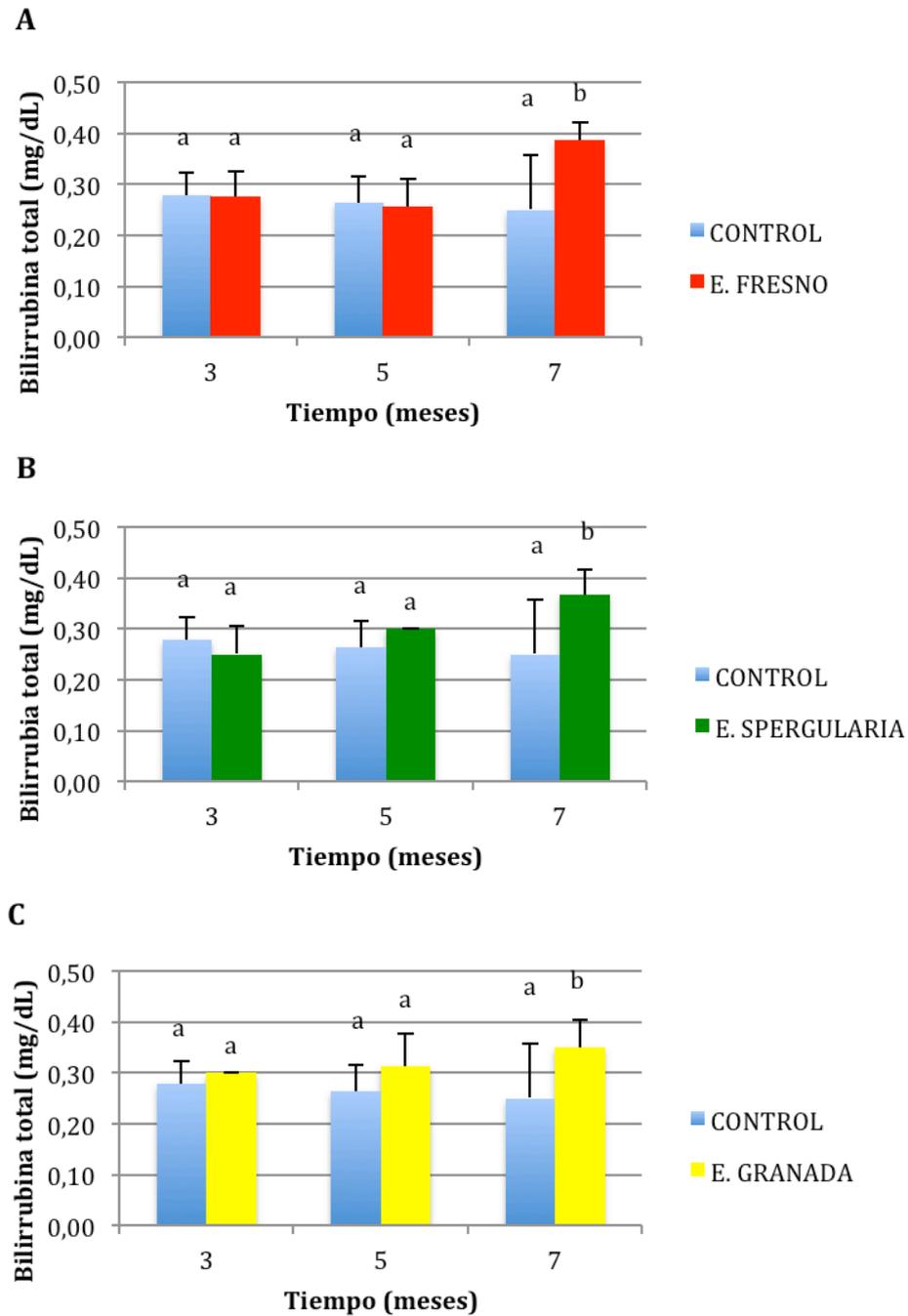


Figura 35. Niveles plasmáticos de bilirrubina total de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Proteína total:

	PROTEÍNA TOTAL (4,51 ± 1,75 g/dL)*		
GRUPO	MES 3	MES 5	MES 7
CONTROL	6,54 ± 0,38	6,61 ± 0,29	6,91 ± 0,38
E. FRESNO	6,68 ± 0,40	6,71 ± 0,28	6,84 ± 0,30
E. SPERGULARIA	6,83 ± 0,31	6,63 ± 0,30	6,93 ± 0,24
E. GRANADA	5,67 ± 2,00	6,38 ± 0,42	6,80 ± 0,32

Tabla 17. Media y desviación típica de los niveles de proteína total del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10). *Rango de normalidad para la especie.

Respecto a los niveles plasmáticos de proteína total no apreciamos diferencias significativas entre el grupo control y los grupos a los cuales se les ha administrado los diferentes tratamientos. Si podemos apreciar una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el tercer mes, entre el grupo control y el grupo al que se le administro E. granada, siendo mayor el nivel de proteína total plasmática del grupo de animales tratados con E. granada frente al grupo control (Figura 36 C).

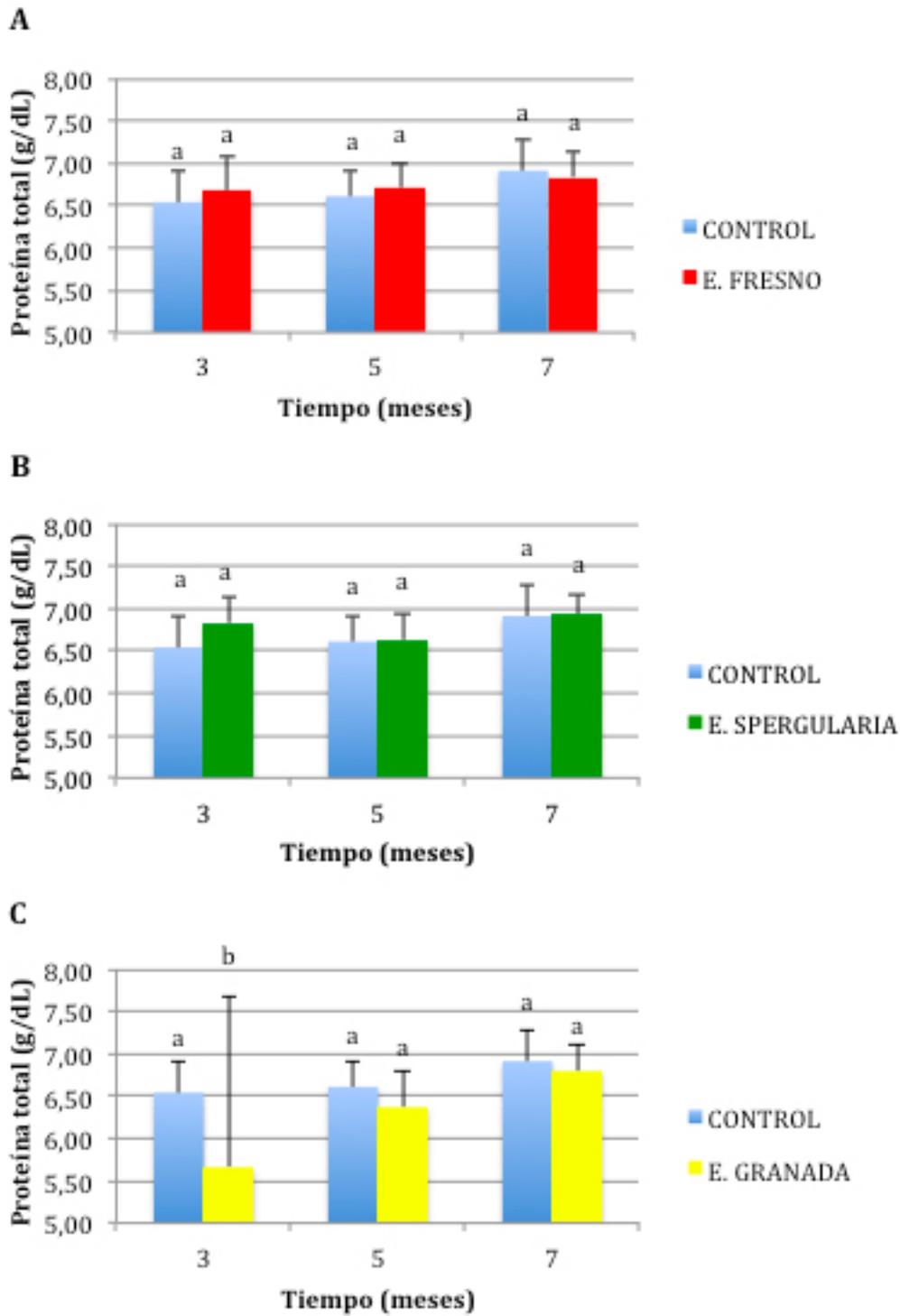


Figura 36. Niveles plasmáticos de proteína total de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

DETERIORO COGNITIVO RELACIONADO CON LA DIABETES:

Test de conducta:

Rotarod:

GRUPO	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	ENSAYO 4
CONTROL	63,54 ± 53,44	119,29 ± 75,30	103,71 ± 52,34	91,81 ± 27,73
E. FRESNO	21,77 ± 27,88	41,87 ± 39,15	77,38 ± 56,47	100,46 ± 48,55
E. SPERGULARIA	68,85 ± 34,41	110,33 ± 41,17	104,04 ± 41,14	151, 11 ± 37,55
E. GRANADA	25,08 ± 25,54	54,67 ± 32,08	81 ± 37,20	120, 92 ± 29,37

Tabla 18. Media y desviación típica del tiempo en los ensayos del Rotarod del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

EL grupo de animales a los que se les administro E. fresno presentaron una evolución durante el periodo de ensayo. Como podemos ver en la Figura 37 A poco a poco aumentan su resistencia.

Al compararlo con el grupo control vemos que en los dos primeros ensayos aparecen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos, por lo que podríamos decir que el grupo control comienza mejor el test de conducta que el grupo E. fresno, sin embargo al final de los ensayos vemos que es el grupo E. fresno el que va mejorando ensayo tras ensayo.

Como vemos en la Figura 37 B, el grupo tratado con E. spergularia posee mayor respuesta frente al test realizado, existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al grupo control, siendo favorable para el grupo E. spergularia.

Los animales tratados con E. granada comienzan pero los ensayos, existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) frente al grupo control, pero al final del periodo del ensayo podemos ver que su resistencia es mayor que la del grupo control sin apreciar diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 37 C).

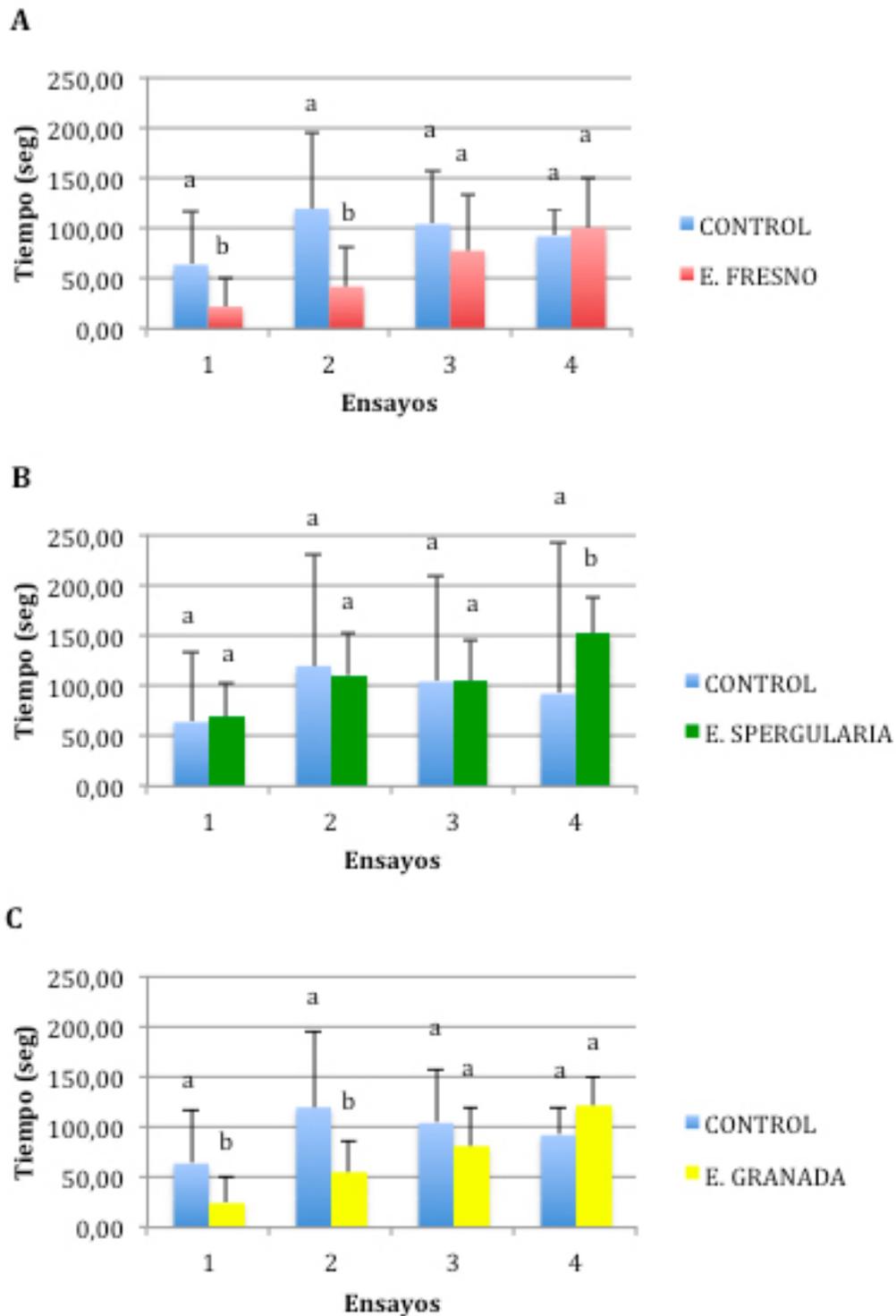


Figura 37. Resultados Test Rotarod para los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

Grip test:

GRUPO	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
CONTROL	19,06 ± 25,55	15,50 ± 13,45	17,14 ± 17,31
E. FRESNO	4,50 ± 1,86	12,86 ± 12,56	24,81 ± 25,83
E. SPERGULARIA	18,75 ± 11,14	37,77 ± 24,55	59,69 ± 39,32
E. GRANADA	3,91 ± 3,09	10,75 ± 8,68	15,09 ± 14,25

Tabla 19. Media y desviación típica del tiempo de los ensayos del Grip test del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

En la Figura 38 A vemos que el grupo E. fresno al comienzo del ensayo presenta menos fuerza de agarre que el grupo control, existiendo diferencia significativa ($p < 0,05$) favorable para el grupo control, sin embargo en el ultimo ensayo el grupo de animales tratados con E. fresno presentan mayor fuerza de agarre que el grupo control, no apreciándose diferencias significativas.

Como podemos ver en la Figura 38 B, los animales a los que se les administro E. spergularia vemos que con forme se van realizando los ensayos va aumentando la fuerza de agarre del animal frente a los animales del grupo control, siendo esta diferencia significativamente positiva para el grupo E. spergularia ($p < 0,05$).

En la Figura 38 C vemos que los animales a los que se les administro E. granada comienzan pero el ensayo, existiendo diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0,05$), pero poco apoco van ganando fuerza de agarre llegando a igualarse a los animales del grupo control.

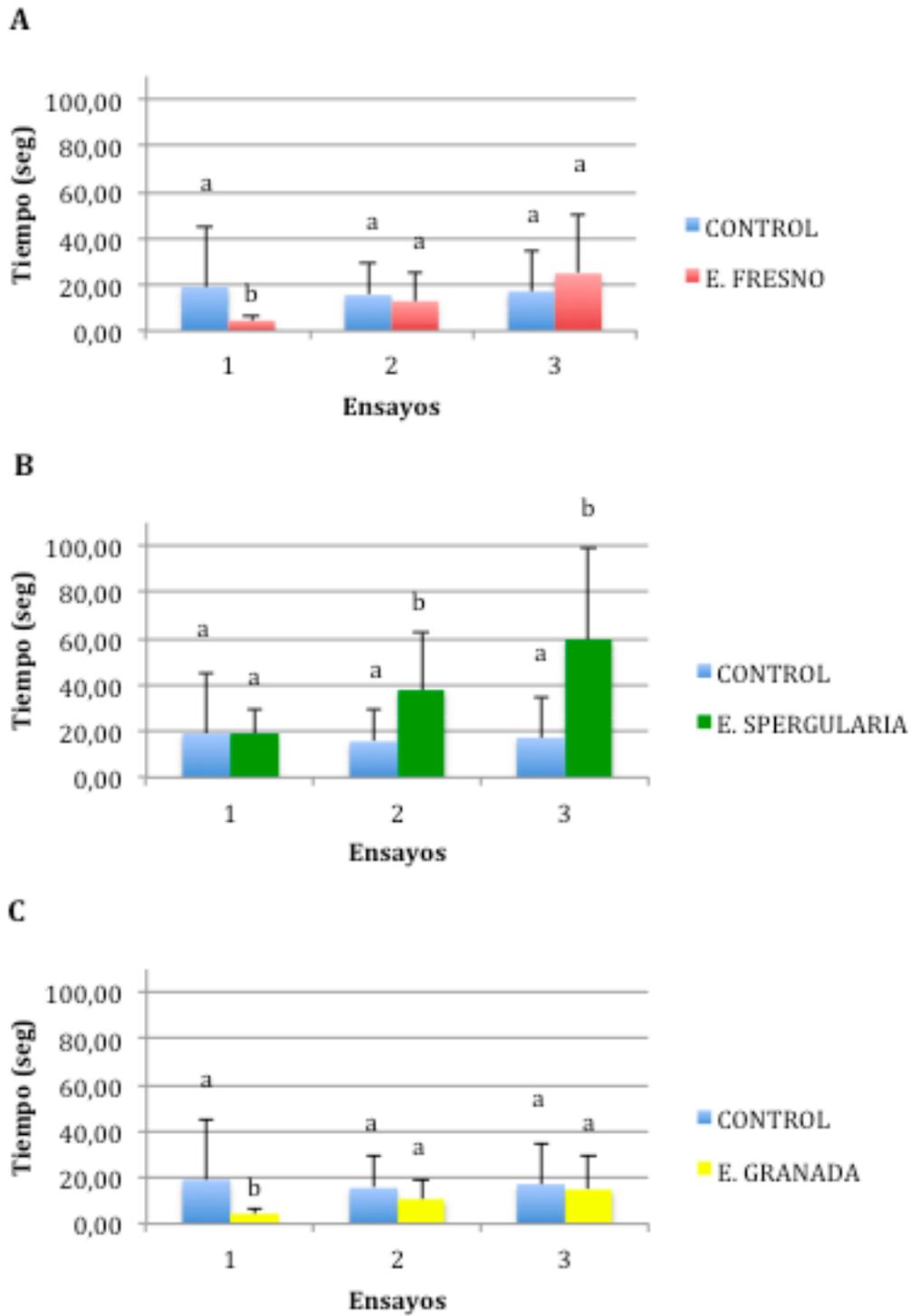


Figura 38. Resultados Grip test para los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

A parte de estos test de conducta se intento realizar dos test más, el Pole test y el Actímetro, pero no se pudo obtener resultados debido a que los animales son tan obsesos que tienden a no moverse mucho, por lo tanto no se puede medir la actividad espontanea del ratón (Actímetro) ni la coordinación (Pole test).

Biomarcadores:

Homocisteína:

GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TIPICA	ERROR TIPICO
CONTROL	4,39	0,84	0,34
E. FRESNO	2,92	0,43	0,16
E. SPERGULARIA	4,29	0,89	0,30
E. GRANADA	3,99	0,83	0,31

Tabla 20. Media y desviación típica de los niveles de homocisteína del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Los niveles de homocisteína fueron superiores en el grupo control frente al grupo tratado con e. fresno, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las concentraciones de ambos grupos (Figura 39 A).

Tanto los animales del grupo E. spergularia como los del grupo E. granada presentaron una disminución en los niveles de homocisteína frente al grupo control, no presentando diferencias significativas entre dichos valores (Figura 39 B y C).

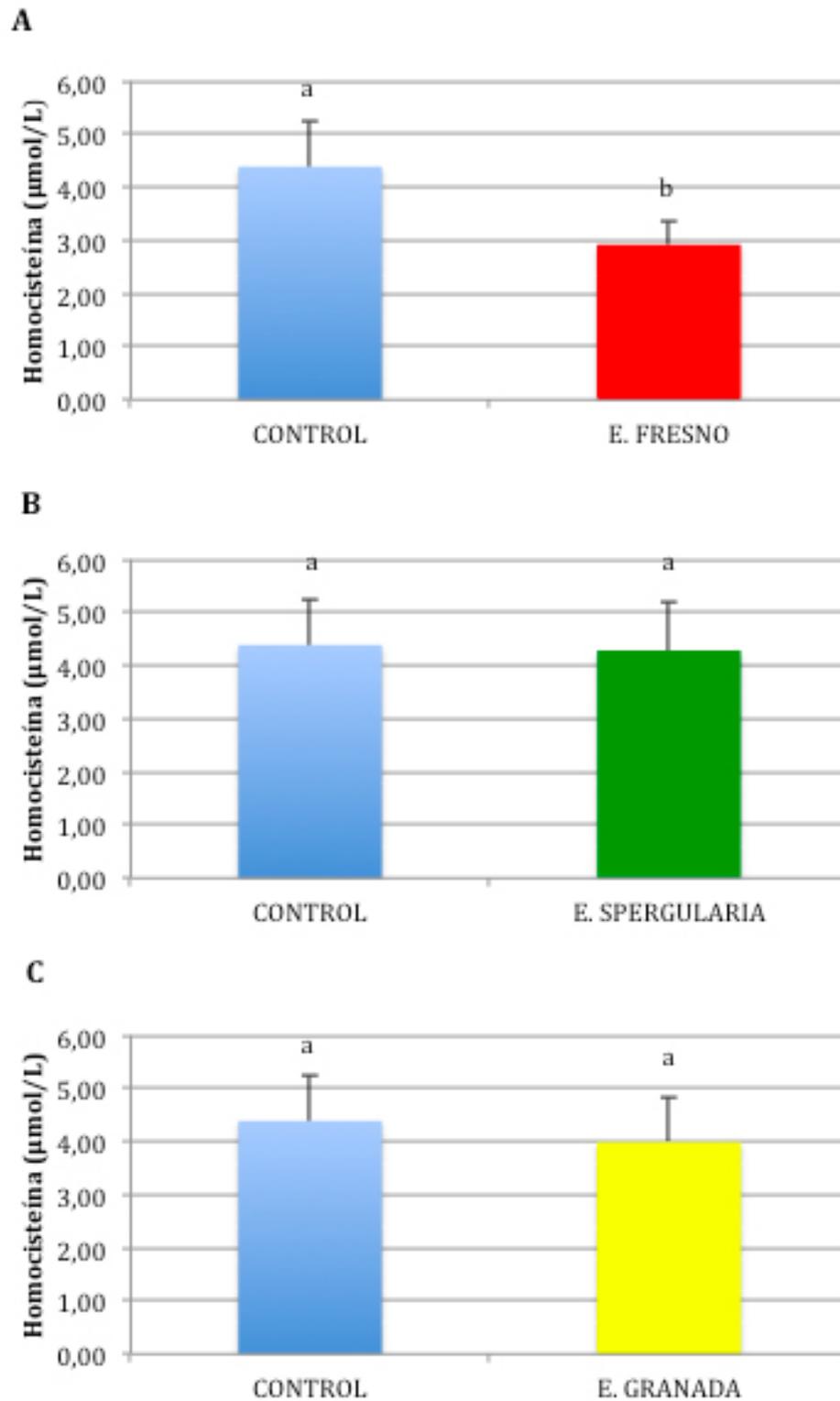


Figura 39. Niveles plasmáticos de homocisteína de los grupos E. fresco (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

β -Amiloide:

GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN TIPICA	ERROR TIPICO
CONTROL	41,81	12,99	4,91
E. FRESNO	37,88	10,98	3,88
E. SPERGULARIA	35,90	13,04	4,35
E. GRANADA	22,74	8,23	2,91
CITROLIVE ORAL	4,56	2,09	0,94
CITROLIVE SUBCUTÁNEO	19,28	4,12	1,37

Tabla 21. Media y desviación típica de los niveles de β -Amiloide del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en los niveles plasmáticos de β -Amiloide entre el grupo control y los grupos a los cuales se les ha administrado E. granada, siendo mayor el nivel plasmático de β -Amiloide del grupo control frente al resto de tratamientos. (Figura 40 A).

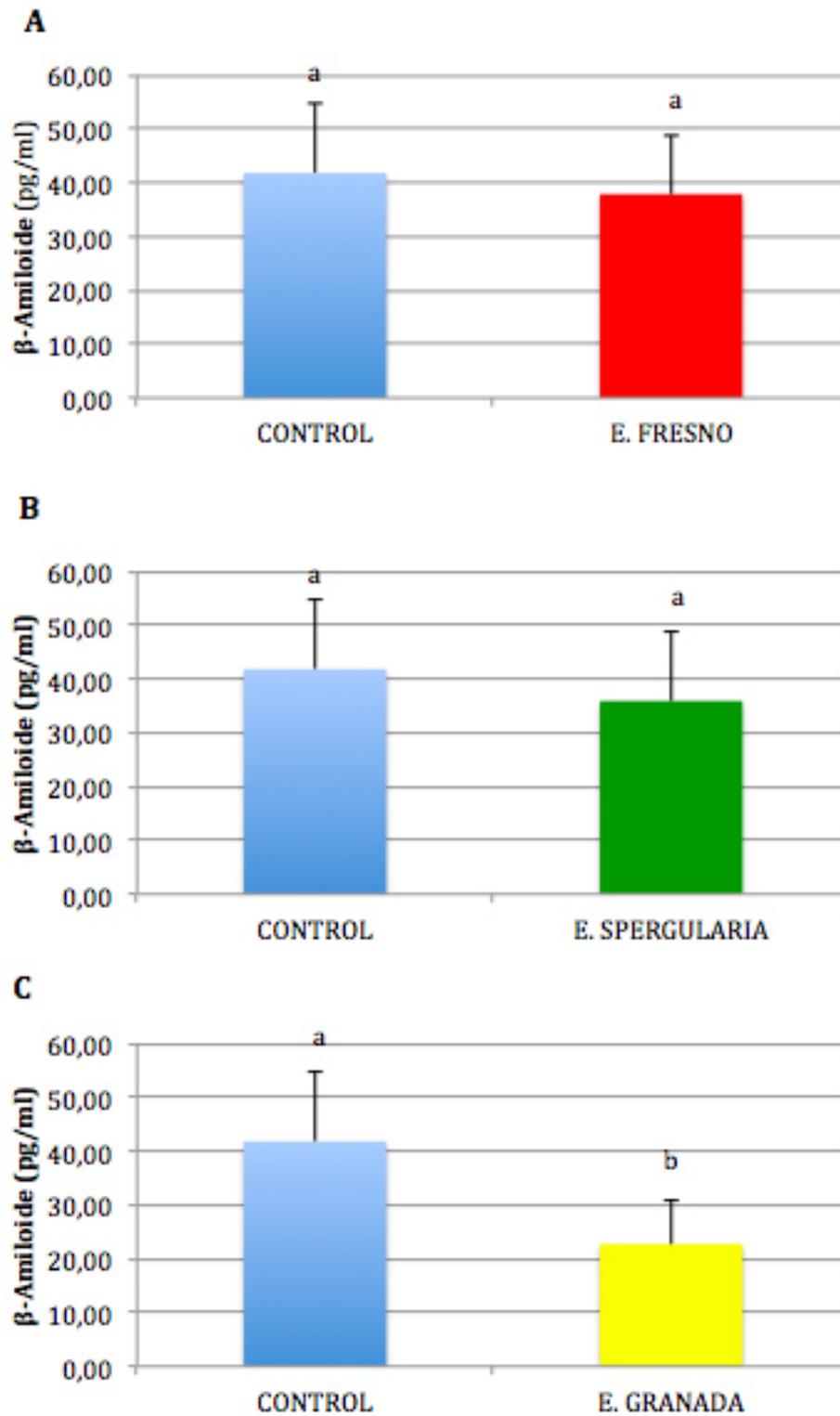


Figura 40. Niveles plasmáticos de β -Amiloide de los grupos E. fresno (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Los datos recogidos en la tabla 22 muestran el porcentaje de la densidad promedio de los islotes pancreáticos presentes en el grupo control y en los grupos de animales a los cuales se les ha administrado tratamiento.

GRUPO	% ÁREA DE ISLOTES		
	MEDIA	DESVIACIÓN TIPICA	ERROR TIPICO
CONTROL	1,06	0,54	0,16
E. FRESNO	1,31	0,63	0,20
E. SPERGULARIA	0,57	0,27	0,09
E. GRANADA	0,69	0,24	0,09

Tabla 22. Media y desviación típica del porcentaje de área de islotes del grupo control y de los grupos tratados durante los 7 meses del experimento. Los valores están expresados con media (n= 7-10).

Únicamente podemos apreciar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo control y el grupo E. spergularia siendo favorable para el grupo control (Figura 41 B).

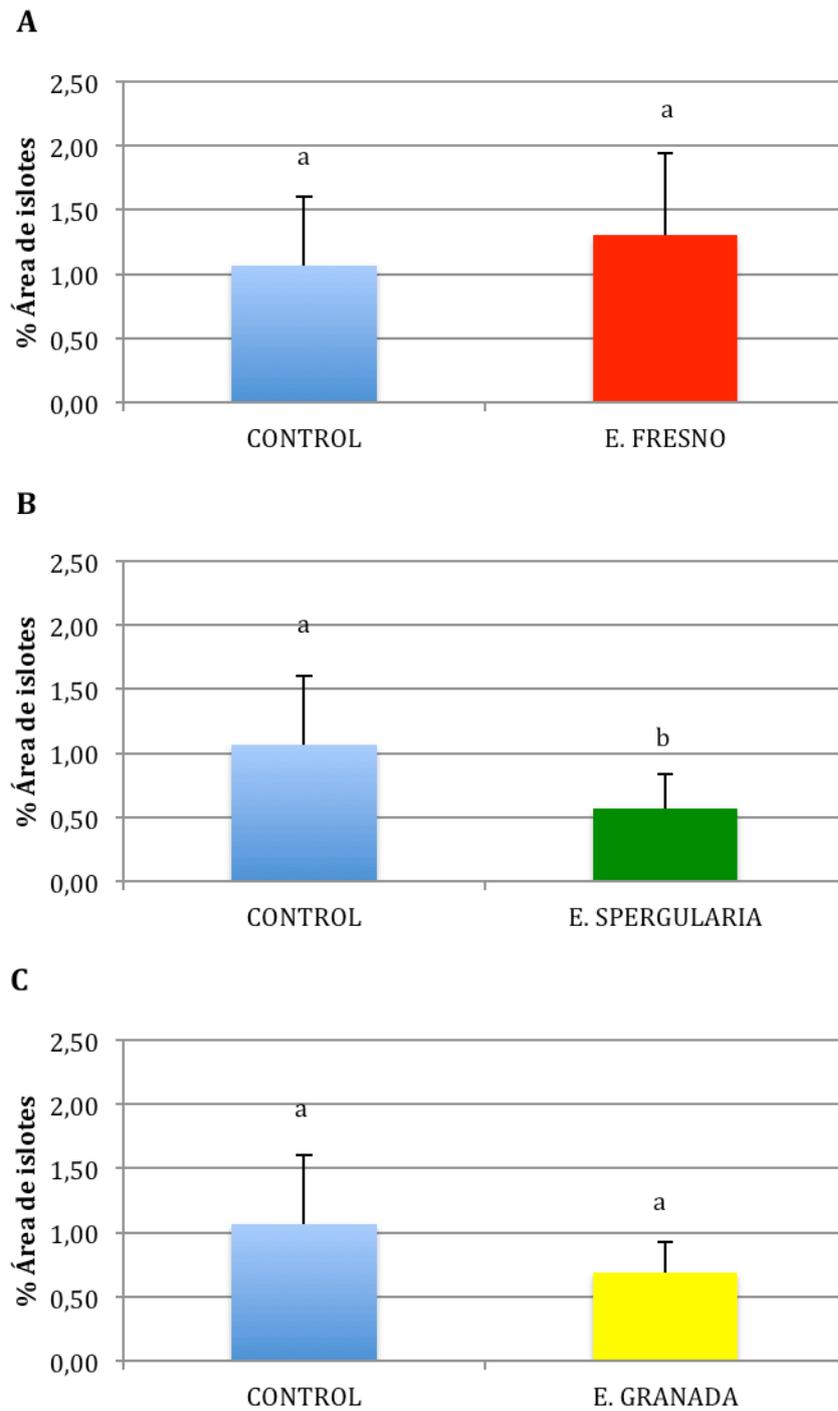


Figura 41. Porcentaje de islotes pancreáticos de los grupos E. fresco (A), E. spergularia (B) y E. granada (C). Los valores están expresados como media \pm DE (n= 7-10). Entre los valores que presentan letras distintas existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

En las figuras 42, 43,44 y 45 podemos ver la diferencia en cuanto a la estructura de los islotes pancreáticos en los diferentes grupos.

En los cortes de los animales a los que se les ha administrado tratamiento se observan contornos más homogéneos, conservándose la estructura del islote pancreático.

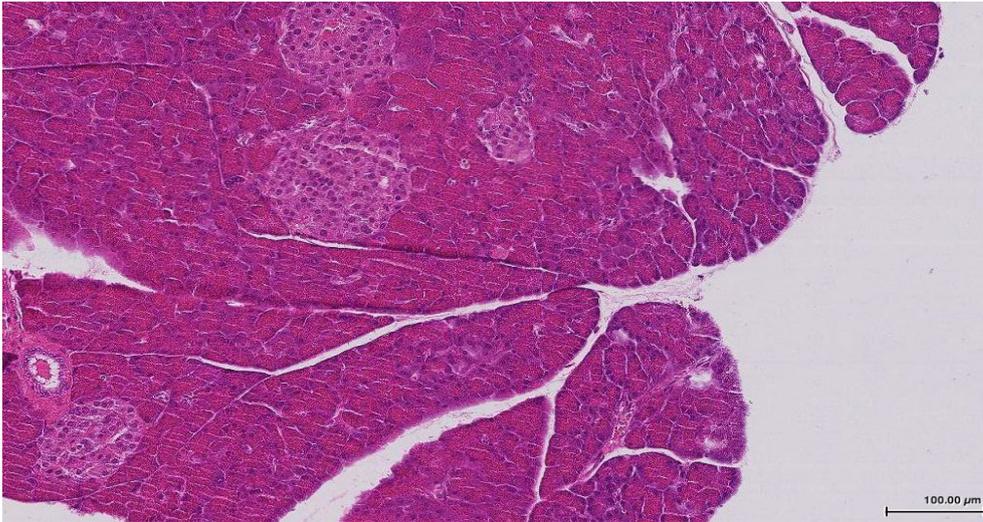


Figura 42. Grupo Control. Sección histológica H.E. aumento 10x

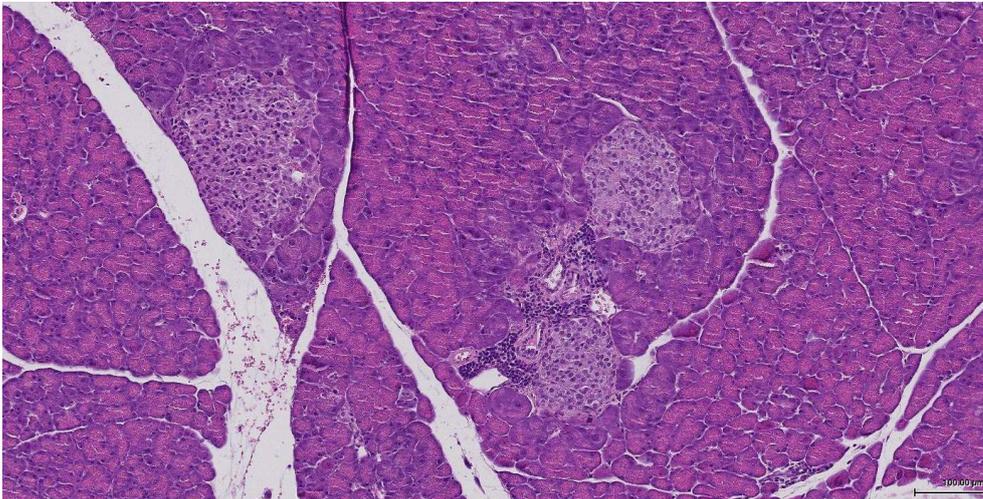


Figura 43. Grupo E. fraxipure. Sección histológica H.E. aumento 10x

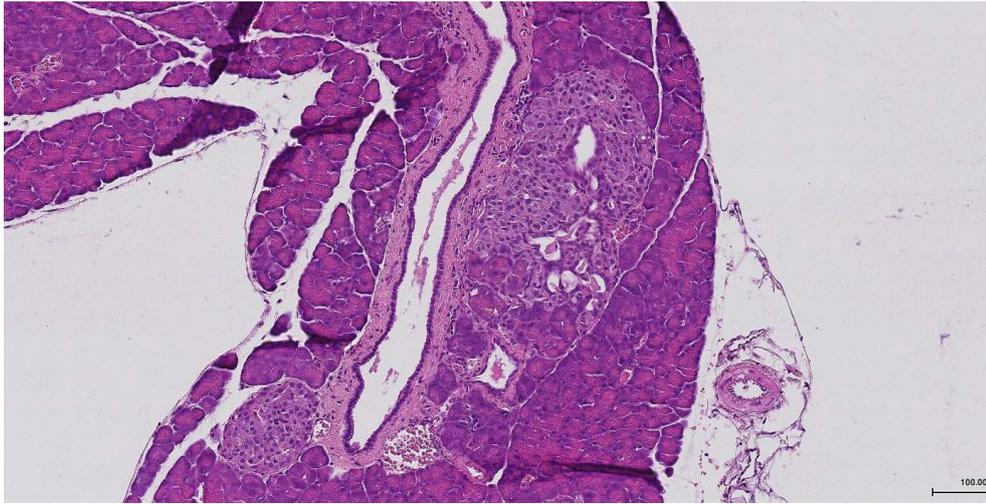


Figura 44. Grupo E. spargularia. Sección histológica H.E. aumento 10x

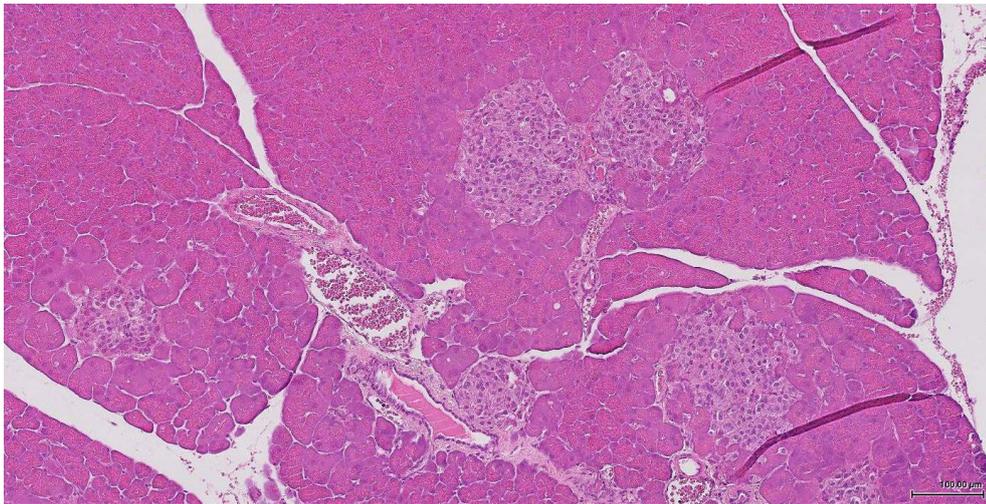


Figura 45. Grupo E. granada. Sección histológica H.E. aumento 10x

VI. DISCUSIÓN

La OMS considera la diabetes como un problema de salud pública. La *Diabetes Mellitus* es una enfermedad multisistémica, ya que produce lesiones en casi todos los órganos al afectar a los vasos sanguíneos, sistema nervioso y en especial a los ojos, riñones, corazón, extremidades, etc.

El incremento de su prevalencia en todo el mundo está generando una gran preocupación clínica y socio-sanitaria. En 1955 existían 135 millones de pacientes diabéticos, y se calculan que pasen a alrededor de 300 millones para el año 2025, por lo que se estima un incremento del 35% de la prevalencia. Esta es mayor en los países desarrollados que en los países en vías de desarrollo y así parece que va a continuar. En los países desarrollados es más frecuente en la mujer y en el grupo de edad de 45 a 64 años, mientras que en los países en vías de desarrollo es casi igual en ambos sexos.

Todos estos datos, destacan la importancia que tienen los avances en los estudios destinados a la búsqueda de medidas terapéuticas, enfocadas tanto a la prevención como al tratamiento.

Existen descritos diversos modelos experimentales potencialmente útiles para el estudio de los distintos aspectos de la DM 2 humana (Arias-Díaz, 2007). La decisión acerca del modelo a utilizar para un experimento en particular es a menudo multifactorial. De modo ideal, los experimentos deberían ser llevados a cabo en varios modelos diferentes, aunque en la práctica los grupos de investigación tienden a acumular experiencia con una cepa determinada. En cualquier caso, es necesario comprender que, en general, un modelo animal a lo más que puede aspirar es a representar un aspecto o subtipo de DM 2 humana, y que, por tanto, hay que extremar las precauciones a la hora de realizar cualquier tipo de extrapolación a la clínica.

Los modelos experimentales de DM 2 son tan complejos y heterogéneos como lo es la enfermedad en humanos. En el espectro patogénico de la DM 2 se encuentra todo el rango de posibilidades, predominando en algunos animales la resistencia a la insulina mientras que, en el extremo opuesto, otros sufren sobre todo disfunción de las células β . También pueden aportar información valiosa para la DM 2 humana aquellos modelos donde la intolerancia a la glucosa es

parte de un fenotipo más complejo, tal como el que incluye obesidad, dislipemia e hipertensión.

Es difícil por tanto hablar del modelo “ideal” a la hora de estudiar la DM 2, pues sólo interpretando los datos procedentes de los diversos modelos es como más probablemente surgirán avances significativos de utilidad para la enfermedad humana.

La introducción de las técnicas de biología molecular dio lugar a la aparición de un gran número de modelos animales útiles para el estudio de la DM 2. Al modificar genes específicos, dichas técnicas permiten, al menos teóricamente, generar modelos casi “a la carta”. Este tipo de modelos se ha desarrollado especialmente en ratones debido a que hay más herramientas moleculares y tecnologías disponibles para esta especie (Plum, 2005).

Los modelos generados mediante este tipo de herramientas moleculares no se encuentran, sin embargo, exentos de limitaciones. El simple hecho de aumentar o disminuir la expresión de un gen puede inducir la alteración de otros muchos por un mecanismo compensador. Así, cuando se elimina por completo el gen del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS1) sería esperable que ocurrieran consecuencias fisiológicas más importantes que las que se obtienen, dado el papel central que posee dicha proteína en la señalización intracelular (Tamemoto, 1994). En este caso la redundancia en la cascada de señalización de la insulina es capaz de anular prácticamente por completo los efectos de la manipulación genética.

Por el contrario, los *knockout* homocigotos para el gen del sustrato 2 del receptor de la insulina (IRS2) desarrollan diabetes alrededor del día 10 de vida, junto con resistencia hepática a la insulina y reducción en la masa de células β pancreáticas (Withers, 1998).

Inicialmente, se realizó un estudio piloto sobre un modelo de DM inducido químicamente mediante la administración de estreptozotocina (STZ) en dosis simples de 1 mg/kg vía intraperitoneal, intentando simular el daño ocasionado a nivel pancreático. Para ello iniciamos un estudio piloto con 3 grupos de animales (1 grupo control y 2 grupos tratados con compuestos fenólicos), sin embargo, dicho experimento no mostró resultados valorables, principalmente por la

gran heterogeneidad de los resultados, debido a que no todos los ratones tratados con la STZ presentaron hiperglucemia y en los que sí la padecieron, ocurrió en distintos tiempos tras la administración del toxico, variando además enormemente las cifras de glucemia entre los ratones (115, 466, 700 mg/dl), lo que redujo enormemente el numero de ratones (n) por subgrupo e imposibilitando correlacionar los resultados finales.

Esto, junto con las limitaciones en cuanto a la posibilidad de ampliar los estudios relacionados con el síndrome metabólico en este tipo de modelo inducido por STZ, hizo que finalmente nos decidiéramos por desarrollar el estudio con el modelo de ratón $LepR^{db/db}$ que comentamos a continuación.

En nuestro trabajo, la elección del modelo experimental estuvo condicionada, además de los hechos anteriormente comentados, por la necesidad del estudio multidisciplinar del que formaba parte este trabajo, Proyecto SENIFOOD (CEN-20091006) ya que, no sólo se pretendían analizar los efectos de los distintos extractos antioxidantes a nivel de la patología diabética, sino también porque interesaba asimismo, valorar su influencia a nivel del síndrome metabólico. Por todo ello se consideró la elección de la cepa de ratones $LepR^{db/db}$ como un modelo apropiado para estudiar tanto la diabetes, como el síndrome metabólico en general.

La elección de este modelo espontáneo con una alteración genética, garantizó unas condiciones homogéneas en todos los grupos experimentales, como podemos apreciar en los resultados mostrados, a diferencia de lo que podría ocurrir con otros modelos inducidos, mediante fármacos, hormonas, o manipulación genética (Arias-Díaz, 2007), lo que facilitó la planificación y desarrollo del estudio.

El modelo de DM 2 en ratones $LepR^{db/db}$ corresponde a un modelo de inducción espontáneo de diabetes, en el que el gen de la diabetes se transmite de modo autosómico recesivo y codifica una mutación puntual en el gen del receptor de la leptina, dando lugar a un déficit de señalización de dicha hormona adipocitaria (Chen, 1996). Este modelo espontáneo es utilizado en diversos estudios, como DM

2 (Del Rey, 1989; Kim, 2006; Strowski, 2006), obesidad (Cao, 2003), reparación de tejidos (Rodgers, 2006), esteatosis (Brun, 2007), etc.

La mutación db/db muestra muchas de las características de la DM 2 humana (Sharma, 2003). La evolución de estos ratones es bifásica, mostrando primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia. La fase hiperinsulinémica aparece alrededor de los 10 días de vida, acusando ya una discreta elevación de la glucemia alrededor del mes, que se hace acusada hacia los 2 meses de edad. A los 5 ó 6 meses, el peso corporal comienza a descender en paralelo con una degeneración de las células β de los islotes pancreáticos (Like, 1972), entrando en la fase hipoinsulinémica.

En nuestro estudio, al analizar los resultados relativos a las variables morfológicas podemos observar como al inicio del estudio todos los animales se comportaron según correspondía a la media inherente a la cepa, sexo y edad ofrecida por el Laboratorio de referencia (The Jackson Laboratory, JAX), que nos suministró los ratones. Está descrito que este modelo, utilizado también en estudios de obesidad, puede alcanzar en su pico máximo, valores de hasta 60 g, como consecuencia de la mutación que afecta al gen de la leptina (Arion, 2010).

El peso corporal del grupo control superaba al de todos los grupos tratados, presentado diferencias estadísticamente significativas para el grupo tratado con extracto de spergularia. Existen pruebas respecto a que el extracto de spergularia origina disminución del peso corporal (Jouad, 2000; Jouad 2003). Este efecto ha sido relacionado, en parte, con la capacidad de este extracto para secretar GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) (Jouad, 2000). El GLP-1 es una hormona gastrointestinal, secretada principalmente después de las comidas, lo que estimula la utilización de glucosa por aumento de sensibilidad a la insulina; e inhibe la liberación de glucagón, inhibiendo con ello la vía de la glucogénesis (Holst, 2008).

La utilización de los polifenoles, en concreto el extracto de fresno, ha sido descrita en patologías como la obesidad (Ibarra, 2011), por su acción en la inhibición de la diferenciación de los adipocitos y por la inhibición del metabolismo de los lípidos a través del aumento

de la modulación de la vía de señalización del PPAR- α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha), la cual está involucrada en la homeostasis energética (Bai, 2010).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo con el extracto de granada revelaron también una reducción significativa en el peso corporal de los animales del estudio, así como un menor índice de conversión alimenticio, coincidiendo estos resultados con diversos estudios que han mostrado una supresión de la obesidad relacionada con la inflamación (Hontecillas, 2009), y una reducción en el incremento de peso en ratones tratados con extracto de granada (Vroegrijk, 2011).

La obesidad es el factor etiológico más directamente relacionado con la aparición de la DM 2. De forma global, el 90% de los diabéticos son diabéticos tipo 2 y de esos, el 90% presenta o sobrepeso u obesidad (OMS, 2012). Por el contrario, la pérdida de peso aumenta la sensibilidad a la insulina en los diabéticos (Girousse, 2013). Parece que el mecanismo clave que relaciona la obesidad con la DM 2 es la insulinoresistencia; otro hecho importante, es el tiempo de evolución de la obesidad que es un factor de riesgo independiente y además constituye el factor modificable más importante para la diabetes.

La probabilidad de disminuir o retrasar la progresión de DM 2 con un tratamiento efectivo de la obesidad ha llevado a la búsqueda de tratamientos eficaces a largo plazo, y es una de las razones que justifican el estudio para encontrar productos que, contribuyendo a mejorar la glucemia de forma directa, pueda favorecer a su vez la disminución del incremento del peso asociado a la DM 2. En patología humana, algunos pacientes con DM 2 pueden dejar de tomar medicamentos después de una pérdida de peso intencional, aunque la diabetes siga estando presente.

En nuestro estudio, la ingesta de los animales fue, en general, superior en los animales tratados con polifenoles que en los controles. Este hecho destaca la hiperfagia que caracteriza a los animales de este modelo, que es más notoria en las primeras semanas de vida, estabilizándose hacia la semana 10. En ese momento cobran mayor importancia otros mecanismos en el desarrollo de la obesidad (Vasselli,

1985). Este aumento de la ingesta tiene su origen en el deterioro de la acción de la leptina y, por lo tanto, uno de sus principales efectos, el control de la ingesta se encuentra comprometido (Niswender, 2001).

Una ingesta superior en los animales tratados, principalmente del extracto de spergularia y extracto de fresno, unida a un menor incremento de peso en los grupos tratados respecto a los controles, se traduce en un índice de conversión alimenticio negativo. El menor índice de conversión podría interpretarse como un mayor gasto energético por parte de los animales tratados, debido a una mayor actividad física.

En cuanto al estudio bioquímico realizado mensualmente (albúmina, alanina aminotransferasa, BUN, bilirrubina y amilasa), los resultados de los distintos parámetros estudiados se encontraban dentro del rango de referencia de normalidad sin diferencias significativas, lo que indica el correcto funcionamiento de los distintos órganos (función hepática, renal, pancreática). (Kaneko, 1997).

Por otra parte y con el objetivo de analizar los efectos potenciales de los productos estudiados sobre los parámetros relacionados con la resistencia a la insulina, realizamos distintas determinaciones (glucosa, hemoglobina glicosilada, insulina y parámetro HOMA-IR).

En este sentido, muchos flavonoides han demostrado sus efectos beneficiosos en la prevención de la diabetes, en parte gracias a sus metabolitos fenólicos secundarios (Crozier, 2009); en nuestro estudio los resultados mostraron una mejoría general en cuanto a los diferentes parámetros analizados para valorar la DM 2. Así, los niveles de glucemia fueron menores en general para los grupos tratados, mostrando diferencias significativas además en el caso del grupo que recibió extracto de fresno, que presentó una mejoría significativa en el 6º mes de tratamiento respecto al grupo control. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados previamente con este producto (Ibarra, 2011), donde se obtuvieron reducciones de los niveles de glucosa de un 76,52%.

El hecho de que los otros grupos tratados no mostraran diferencias significativas en cuanto a los niveles de glucemia, creemos que podría estar directamente relacionado con las características del modelo. Pues

se trata de un modelo espontáneo de diabetes que presenta elevada hiperglucemia (Valores hasta 1000 mg/dl) desde la 5ª semana de vida, y estamos valorando extractos naturales que, habiendo mostrado efectos beneficiosos en otros modelos experimentales (Hamden 2009; Jemai, 2009; Ibarra, 2011), es posible que no sean capaces por sí solos de contrarrestar completamente los niveles plasmáticos extremos de glucosa que presenta este modelo experimental de DM 2. Por ello sería recomendable plantear el estudio en otro modelo alternativo, o asociar el estudio con la administración concomitante de fármacos antidiabéticos junto con este tipo de extractos naturales, para valorar su posible efecto coadyuvante sobre la glucemia.

También debemos tener en cuenta que los niveles de glucosa en sangre se suele alterar en situaciones de estrés, hecho que puede producirse durante las manipulaciones de los animales para las extracciones o determinaciones de la glucemia. Por ello, para comprobar los valores promedios de glucemia de los últimos meses, determinamos los niveles de la hemoglobina glicosilada. Este parámetro es más estable, es decir, no se ve influenciado por los cambios bruscos que sí pueden afectar a la glucemia determinada puntualmente. En este aspecto los resultados obtenidos fueron similares a los observados respecto la glucemia, correspondiendo los valores más bajos al grupo tratado con extracto de fresno, a pesar de no existir diferencias significativas respecto al control.

El HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) es un modelo matemático presentado por Matthews y cols. (1985), que permite realizar estimaciones de resistencia insulínica y función de las células beta mediante las concentraciones de la glucosa y la insulina plasmáticas en ayunas.

De acuerdo con este modelo, un elevado índice de HOMA-IR significa una baja sensibilidad a la insulina y por lo tanto una mayor resistencia a la misma. Uno de los efectos más importantes que presentaron los grupos tratados con antioxidantes fue el descenso de la concentración plasmática de insulina y del parámetro HOMA-IR, sugiriendo esto una mejora de la respuesta a la insulina.

Existen numerosos trabajos donde se han estudiado otros antioxidantes, algunos incluso demuestran la capacidad de estos flavonoides para mejorar la sensibilidad a la insulina y el metabolismo glucídico (Kato, 2008). Los mecanismos propuestos para estas acciones son “fundamentalmente” su actividad antioxidante, al igual que ocurre con otros compuestos similares como el epigalo-catecol-galato del té verde o el γ -tocoferol (Singh 2008; Venables, 2008) y a su actividad antiinflamatoria, demostrada tanto in vitro como in vivo en diferentes modelos experimentales de enfermedades inflamatorias (Hollebeeck 2012; Karasu 2012).

En nuestro trabajo, estos dos parámetros mostraron diferencias significativas en cuanto a los resultados obtenidos en el grupo del extracto fresno, donde se observaba una disminución del 46 % en los niveles del HOMA-IR respecto al control. Estos valores se correspondían con una disminución del 22% de los niveles de insulina, lo que pone de manifiesto una menor resistencia a la insulina en los animales que tomaron E. fresno. Dichos resultados se correlacionan positivamente con los animales que presentaban menores niveles de glucemia y de hemoglobina glicosilada.

En general, todos los grupos de los animales tratados con polifenoles mostraron menores niveles de insulina y menores valores de HOMA-IR que los del grupo control. Esto demostraría que, los animales tratados con los productos propuestos, presentan menor resistencia a la insulina que los controles.

Otro de los parámetros considerados para evaluar el efecto de los productos administrados sobre la resistencia a la insulina en este modelo, fue la adiponectina. Los valores de adiponectina se han correlacionado con un mayor o menor grado de resistencia a la insulina en población india americana y caucásica (Lindsay, 2002; Spranger, 2003; Havel, 2004). Algunos estudios realizados con diferentes poblaciones han revelado que las concentraciones bajas de adiponectina pueden predecir de forma independiente el desarrollo futuro de resistencia a la insulina y DM 2 (Lindsay, 2002; Snehalatha, 2003; Spranger, 2003).

Aunque tradicionalmente se ha considerado al músculo esquelético como el lugar principal de resistencia a insulina, actualmente está ampliamente aceptado que el sitio primario de ésta es en el tejido adiposo (Sánchez-Recalde, 2001; Arner, 2003).

Igualmente, la concentración de adiponectina en pacientes con intolerancia a la glucosa, sobre todo en pacientes con DM 2 y diabetes gestacional, es inferior a la de individuos normoglucémicos (Weyer, 2001; Hanley, 2003; Retnakaran, 2004). Stefan y colaboradores (2003), encontraron una correlación negativa entre la adiponectina plasmática y la producción endógena de glucosa, lo que apoya un papel de esta hormona en el metabolismo glucídico. Todo ello sugiere un papel de la hipoadiponectinemia en la patogenia de la DM 2. La concentración plasmática de adiponectina también es superior en pacientes con diabetes tipo 1 en comparación con los individuos no diabéticos, pero el tratamiento con insulina no afecta a los valores de adiponectina (Imagawa, 2002).

Los ratones con déficit de adiponectina presentan una mayor resistencia a la insulina que los ratones de la cepa salvaje o los heterocigotos para esta deficiencia (Maeda, 2002). En estos ratones, la hiperglucemia y la resistencia a la insulina es reversible mediante la administración de adiponectina exógena o la expresión de adiponectina recombinante mediada por adenovirus (Maeda, 2002; Beltowski, 2003).

El papel de la adiponectina en la reducción de la resistencia a la insulina se ha estudiado también en modelos animales con lipodistrofia, así como en pacientes con lipodistrofia de origen viral (Comuzzie, 2001). Ambas se caracterizan no sólo por una disminución del peso corporal y resistencia a la insulina, sino por la aparición de hipoadiponectinemia. El tratamiento de la lipodistrofia en animales con dosis fisiológicas de adiponectina mejora significativamente la hiperglucemia y la hiperinsulinemia (Hotta, 2000). Algunos autores también han sugerido que el tratamiento con adiponectina podría ser útil en pacientes con lipodistrofia viral (Comuzzie, 2001).

Aunque la hiperinsulinemia podría explicar las causas de hipoadiponectinemia en pacientes o modelos animales con DM 2,

parece poco probable que actúe por sí sola como mediadora directa, ya que los valores de adiponectina también permanecen bajos durante fases posteriores de la DM 2, cuando las concentraciones de insulina son bajas (Chandran, 2003).

Probablemente es la acción de la insulina o su ausencia, incluida la transducción de su señal, el factor que regula los valores de adiponectina, más que las concentraciones absolutas de insulina presentes en la sangre (Chandran, 2003). En favor de esta hipótesis está el hecho de que la secreción de adiponectina requiera PI-3K, un intermediario principal de la vía de señalización de la insulina (Bogan, 1999). Así, por ejemplo, la actividad del sustrato receptor estimulado por la insulina (IRS- 1), que está asociada a la vía de señalización PI-3K, también está reducida en adipocitos de individuos con diabetes tipo 2 (Smith, 1999). Por lo tanto, es probable que la reducción de la actividad PI-3K en adipocitos de pacientes con DM 2 contribuya a los valores reducidos de adiponectina (Arita, 1999).

En conjunto, estos datos sugieren que la adiponectina es requerida para la regulación de la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa *in vivo* y, por tanto, podría ser útil como agente terapéutico de la resistencia a la insulina.

Esta relación entre DM 2 y adiponectina ha sido igualmente confirmada en distintos estudios genéticos. Mediante un análisis genómico se ha encontrado un locus que confiere susceptibilidad a la DM 2, al síndrome metabólico y a la enfermedad coronaria en el cromosoma 3q27, justo donde se localiza el gen de la adiponectina (Imagawa, 2002). Además, los individuos que presentan valores séricos bajos de adiponectina debido a la extraña mutación I164T muestran características del síndrome metabólico y enfermedad aterosclerótica (Hara, 2002; Matsuzawa, 2004). También hay un polimorfismo T→G silencioso en el exón 2, muy común, que se ha asociado con variaciones en las concentraciones plasmáticas de adiponectina (Stumvoll, 2002). La presencia del alelo G se asocia con un aumento de peso y una menor sensibilidad a la insulina, especialmente en individuos con antecedentes familiares de diabetes.

Sin embargo, dado que el polimorfismo no comporta cambios en la secuencia de aminoácidos, se desconoce el mecanismo de esta asociación (Goldfine, 2003). También el polimorfismo 276 (G→T) en el gen de la adiponectina se asocia con un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2, aunque sólo en pacientes con la variante 12Ala de PPAR γ , mientras que el polimorfismo -4034 (C→C) se asocia con un riesgo menor (Hu, 2004). Por tanto, los polimorfismos en el locus del gen que codifica la adiponectina podrían ser responsables, al menos parcialmente, de la patogenia de la resistencia a la insulina en algunos individuos con diabetes (Chandran, 2003; Díez, 2003).

Por último, también se ha sugerido que el nexo entre la DM 2 y la obesidad podría ser un incremento crónico de los ácidos grasos libres en el plasma. Las concentraciones plasmáticas elevadas de ácidos grasos libres contribuyen a la resistencia a la insulina en el hígado y los órganos periféricos, ya que reducen la translocación del transportador de glucosa GLUT4, alteran la captación de glucosa e inhiben el IRS-1 (Boden, 2002). Además, el incremento de los ácidos grasos libres tiene un efecto lipotóxico sobre el páncreas, probablemente por inducción de la producción de óxido nítrico (NO), que estimula la apoptosis celular (Boden, 2002; Arner, 2003).

Los resultados de nuestro estudio coinciden con los de otros autores (Shabrova, 2011), donde la administración de diferentes extractos de polifenoles en la dieta consiguieron incrementar los niveles plasmáticos de adiponectina.

En nuestro estudio el grupo de animales que recibió extracto de *spergularia* fue el que presentó mayores valores de adiponectina, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Estos resultados coinciden también con el hecho de que fue el grupo con menor peso al final del estudio, como hemos comentado anteriormente. Estos datos confirman otros estudios, donde también se ha descrito la existencia de la relación inversa existente entre el porcentaje de grasa corporal y los niveles de adiponectina plasmática (Ouchi, 2003; Tesouro, 2012; McCourt, 2013).

El papel del TNF- α en la resistencia a la insulina en la obesidad humana es controvertido. Estudios iniciales concluyeron que la

expresión de TNF- α en el tejido adiposo está aumentada en humanos obesos, se normaliza con la pérdida de peso y se correlaciona directamente con indicadores de resistencia a la insulina (Hotamisligil, 1995), de modo similar a lo descrito en roedores. Pero otros estudios concluyen que en humanos la expresión adiposa de TNF- α no se relaciona con indicadores de resistencia a la insulina y sólo está incrementada en la obesidad mórbida (Koistinen, 2000).

La administración de anticuerpos anti-TNF- α no mejoró la sensibilidad a la insulina en humanos con DM 2, aunque se ha señalado que esto puede deberse a una vida media corta de los anticuerpos usados, o a la incapacidad de estos anticuerpos de adentrarse en el tejido adiposo (Ryden, 2007). Los defensores de un papel del TNF- α en la resistencia a la insulina en la obesidad humana también destacan el hecho de que los fármacos antidiabéticos de la familia de las tiazolidinedionas inhiben la expresión del TNF- α y la señalización por TNF- α en el tejido adiposo, entre otros efectos (Ryden, 2007).

Se han encontrado diversas variantes del gen para el TNF- α asociadas a la obesidad y la resistencia a la insulina en la obesidad, en algunos estudios genéticos en humanos, pero no en todos en los que se ha estudiado (Rosmond, 2003; Dahlman, 2007).

La patología de la DM 2 se podría asociar en este sentido a un proceso inflamatorio crónico, ya que existe un aumento de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL6), y TNF- α y una concentración plasmática menor de adiponectina, que presenta efectos protectores antiinflamatorios. Las propiedades de los flavonoides como antiinflamatorios ha sido demostrada en estudios previos (Benavente-García, 2008, Dassprakash, 2012). Así una reducción de la concentración de TNF- α se traduciría en una menor inflamación y menor peso corporal (Kern, 1995b; Kern, 2001; Hontecillas, 2009). El consumo de polifenoles en un modelo animal, ha demostrado en estudios previos capacidad de reducir los niveles de TNF- α (Shanmugam, 2008).

Dada la importante contribución del desequilibrio que existe en el tejido adiposo de los ratones LepR^{db/db}, en nuestro trabajo analizamos los efectos de la administración crónica de los diferentes polifenoles

sobre la secreción de la citoquina inflamatoria TNF- α en plasma. Al séptimo mes de tratamiento, la concentración de TNF- α fue superior en el grupo control respecto a los grupos tratados, lo que parece demostrar que redujo el estado inflamatorio general de los animales tratados con la consiguiente reducción de peso.

La evolución de la concentración plasmática de TNF- α a lo largo del estudio mostró un aumento progresivo, tanto en el grupo control como en los grupos tratados, excepto para el grupo de tratamiento con extracto de granada que fue el único que consiguió reducir los niveles de TNF- α desde el principio del estudio hasta el final, presentando una concentración un 40% menor a los 7 meses respecto al grupo control.

La actividad antiinflamatoria *in vitro* de extracto de granada ha sido descrita recientemente (Dassprakash, 2012; Karasu, 2012). Nuestros resultados coinciden con los de estudios previos con el uso de E. granada donde se ha descrito una disminución de la obesidad asociada a la inflamación (Hontecillas, 2009; Bekir, 2013). Hontecillas y colaboradores (2009), demostraron que algunos de los efectos beneficiosos de E. granada estaban mediados por la activación de PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma). Otros estudios han encontrado que E. granada inhibe el TNF- α inducido por hiperactivación de neutrófilos y protege de la inflamación colónica experimental en ratas y humanos (Boussetta, 2009; Hollebeeck, 2012). Los ácidos grasos conjugados tales como el ácido linoleico y ácido linolénico, han atraído recientemente importante atención debido a sus beneficios para la salud en una variedad de modelos de enfermedades inflamatorias y metabólicas crónicas.

El ácido linoleico ejerce sus acciones sensibilizantes a la insulina y anti-inflamatorias a través un mecanismo dependiente de la activación de la proliferación de PPAR- γ (Moya-Camarena, 1999; Bassaganya-Riera, 2004). Este ácido se encuentra en el extracto de granada (Sassano, 2009).

Analizando nuestros resultados obtenidos en este aspecto, podemos proponer como mecanismo implicado en el estado inflamatorio, un aumento de la expresión de iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible) en

detrimento de la isoforma constitutiva endotelial (eNOS), dañando la producción de NO vasodilatador endotelial y favoreciendo el estado inflamatorio sistémico y las alteraciones metabólicas y vasculares (Kapur, 2000).

En este sentido, la actividad antiinflamatoria que se manifiesta en el tejido adiposo con el aumento de la secreción de adiponectina en detrimento de la de TNF- α conllevaría el restablecimiento del equilibrio eNOS/iNOS. El efecto antioxidante que presentan los polifenoles y la mejora de la respuesta a la insulina que producen, también podrían contribuir al efecto antiinflamatorio y por consiguiente a una mayor pérdida de peso.

Por otra parte, los cambios conductuales observados en los animales del grupo control durante el último mes del experimento se relacionaron con una posible alteración a nivel neurológico, relacionada con la patología diabética.

La literatura científica demuestra que en los estudios con animales se refleja la influencia de la diabetes como factor de riesgo en el deterioro cognitivo. En el estudio de Baydas y col. (2003), con ratas diabéticas se observó que existían diferencias cognitivas (dificultades en aprendizaje y memoria), estructurales y neurológicas (las NCAM de diversas regiones cerebrales: el hipocampo, el cerebelo y el córtex), entre las ratas diabéticas y las ratas control. En otro estudio, en este caso el del equipo de Gispen y Biessels (2000), se observaron resultados similares que implican cambios estructurales y neuropsicológicos en la región del hipocampo. Los investigadores concluyen que la patogénesis multifactorial de la diabetes en el encéfalo tiene todavía numerosas lagunas, pero que se reconocen cambios metabólicos y vasculares relacionados con una hiperglucemia crónica.

En nuestro estudio, los test de conducta demostraron que los animales a los que se les administró tratamiento presentaron una mejor evolución durante el periodo de ensayo respecto al grupo control, a pesar de que en la valoración inicial el grupo control presentó mejores resultados en algunos test. Estas diferencias y mejoras en el desarrollo cognitivo podrían estar correlacionadas con una mejor función cognitiva en los animales que tomaron los antioxidantes, ya

que está descrita la importancia de los antioxidantes en esta función (Bhutada, 2010; Dulcich, 2013).

En un intento de corroborar esta teoría analizamos parámetros bioquímicos relacionados con la función cognitiva, como son la homocisteína y el péptido β -amiloide.

La homocisteína, un aminoácido azufrado derivado del metabolismo de la metionina, se ha descrito en diversos estudios como un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares y accidentes vasculares encefálicos cuando su concentración en plasma es ligeramente elevada (Blanco, 2003; Brattstrom, 2000).

Investigaciones recientes sugieren que niveles elevados de homocisteína en plasma pueden contribuir a la disminución de la función neurocognitiva y al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Seshadri, 2002; Quadri, 2004). Por ello se han llevado a cabo estudios sobre modelos animales para analizar el beneficio del uso de antioxidantes sobre los niveles de homocisteína. De este modo, y como ocurre con los productos que hemos analizado, observamos que los animales tratados mostraron unos niveles plasmáticos de homocisteína inferiores a los animales del grupo control. Esta disminución de la concentración de homocisteína, podría estar asociada a la reducción de los daños sobre la función neurocognitiva (Newman, 2007).

La amiloidosis engloba un grupo de patologías clínicas caracterizadas por el depósito extracelular de proteínas de estructura fibrilar en órganos y tejidos. Algunas formas de amiloidosis fueron consideradas como un fenómeno inespecífico asociado al proceso de envejecimiento. No obstante, el aumento de la longevidad y la mejor definición clínica de las enfermedades crónicas han demostrado que el depósito de amiloide puede ser específico para determinadas enfermedades, como son las placas de amiloide en el tejido nervioso de la enfermedad de Alzheimer o el amiloide pancreático en la DM 2.

La proteína amilina tiende a formar oligómeros tóxicos. Estos oligómeros de la misma manera ya descrita en la sinapsis cerebral, pueden contribuir a la pérdida de las células beta en la DM 2 (Haataja, 2008).

En nuestro estudio, a partir de los resultados obtenidos, los animales tratados presentaron menores niveles de beta amiloide, siendo posible relacionar estos niveles más bajos con un menor riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, que suelen estar asociadas a la diabetes.

Los factores de riesgo vascular (hipertensión arterial no controlada, diabetes mellitus, dislipidemias, hiperhomocisteinemia), aumentan el riesgo de demencia. La neuropatóloga Suzanne de la Monte (Steen, 2005), propuso el término de diabetes tipo 3. Examinando el tejido cerebral de pacientes fallecidos con enfermedad de Alzheimer, postuló que la enfermedad de Alzheimer podría ser una enfermedad neuro-endocrina asociada con el proceso de señalización por la insulina.

La denominaron diabetes tipo 3 por presentar elementos de la diabetes tipo 1 y de la diabetes tipo 2, pues muestra disminución en la producción de insulina y resistencia a la insulina. Encontraron un 80% de reducción en el número de receptores a la insulina en los pacientes de enfermedad de Alzheimer comparados con los normales. Además, la capacidad de la insulina para ligarse a sus receptores también estaba comprometida.

Como antecedentes de esta idea podemos citar el estudio de Rotterdam publicado en 1999 por Ott y colaboradores sobre "Diabetes mellitus y el riesgo de demencia". Se estudiaron 6.370 pacientes ancianos durante 2,1 años, y 525 desarrollaron demencia; 89 de estos fueron catalogados como enfermedad de Alzheimer. La presencia de Diabetes mellitus doblaba el riesgo de presentar demencia y los pacientes en tratamiento con insulina tenían un riesgo cuatro veces mayor.

No sólo la diabetes sino también el aumento de peso y la obesidad, así como el estadio previo de la diabetes, es decir la resistencia a la insulina, constituyen un factor predisponente a la enfermedad de Alzheimer (Razay, 2007; Beydoun, 2008).

La insulina cruza la barrera hemato-encefálica y es producida también en el cerebro. Los receptores a la insulina están localizados en la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el hipocampo, el cerebelo y el hipotálamo. Precisamente en las áreas donde se procesan los

conocimientos.

Por último la diabetes provoca también complicaciones tardías en distintos órganos, entre ellos daños pancreáticos. Que se suelen caracterizar por la disminución del volumen o destrucción de los islotes pancreáticos así como por una disminución del número de dichos islotes.

Muchos estudios han demostrado que estos extractos disminuyen los niveles de glucemia, protegiendo con ello de las complicaciones tardías que se pueden generar en órganos como el páncreas (Jouad, 2000; Hamden 2009; Jemai, 2009; Fuhrman, 2010; Ibarra, 2011). En nuestro estudio, la histología del páncreas de los animales tratados con extracto de fresno, mostró un mayor porcentaje de islotes pancreáticos, resultados que a nivel bioquímico se correlacionaron con menores niveles de glucemia y hemoglobina glicosilada, sin embargo, en los otros dos grupos tratados, el porcentaje de islotes pancreáticos fue menor. Los altos niveles de glucemia que caracterizan al modelo con el que hemos trabajado, o el grado de patología diabética que presentaban los animales en el momento en el que se apreció la mejoría en la glucemia pudo influir en estos resultados.

En la actualidad, no existe un único tratamiento eficaz para todos los enfermos diabéticos sobre el control de la glucemia. Ni tampoco para regular el perfil inflamatorio alterado que conduzca a un descenso en el desarrollo de complicaciones vasculares y neurológicas. Por tal motivo, surge la necesidad de investigar nuevas fuentes potenciales de sustancias que ayuden a regular el metabolismo de la glucosa y el perfil inflamatorio, retrasando el desarrollo de complicaciones vasculares sin deteriorar la función del páncreas.

VII. RESUMEN

La DM constituye un trastorno metabólico caracterizado por niveles elevados de glucosa en sangre o hiperglucemia, ocasionado por defectos en la secreción de insulina, la mala función de la misma o más frecuentemente de ambos, que suele asociarse con lesiones secundarias en diversos órganos, especialmente vasos sanguíneos, ojos, riñones, páncreas, sistema nervioso, etc.

En los últimos años, las sustancias polifenólicas han recibido una gran atención debido a su potencial para la prevención de algunas enfermedades crónicas muy prevalentes, gracias a su actividad antioxidante de restricción del estrés oxidativo.

El objetivo de nuestro trabajo experimental ha sido abordar el estudio de la efectividad de tres productos antioxidantes: extractos de fresno, spergularia y granada, en un modelo animal de DM tipo 2, a través de la evolución del peso corporal y el índice de conversión; los marcadores relacionados con la glucemia; la histomorfometría del páncreas y el deterioro cognitivo (biomarcadores y test de conducta).

Para la realización del estudio, utilizamos 40 ratones LepR^{db/}_{db} hembra, divididos en cuatro grupos (n=10), control y tres de tratamiento con los extractos citados. A todos los grupos se les efectuaron determinaciones sanguíneas de glucosa y medida de los pesos semanalmente durante todo el experimento y a los 3, 5 y 7 meses se les realizó el estudio bioquímico. Al finalizar el estudio los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de páncreas para su posterior estudio histológico.

Los resultados más relevantes consistieron en un menor incremento de peso e índice de conversión a partir del tercer-cuarto mes de los animales tratados. Así mismo, los animales de los grupos de tratamiento presentaron menor resistencia a la insulina, mostrando el grupo E. fresno los niveles mas bajos de glucemia y hemoglobina glicosilada. A nivel histológico este grupo también fue el que presentó mayor porcentaje de islotes pancreáticos. También el uso de los polifenoles mejoró la función cognitiva de los animales tanto a nivel bioquímico como a nivel conductual.

En conclusión, los polifenoles estudiados en este modelo de DM tipo 2 mostraron una reducción del peso corporal de los animales así como el índice de conversión alimenticio; una ligera reducción en la resistencia a la insulina en todos los grupos tratados, que en el caso del grupo tratado con E. fresno se asociaba también a una disminución de los niveles de glucemia y un mayor número de islotes pancreáticos.

Todos los tratamientos evidenciaron una mejora en la función cognitiva.

VIII. CONCLUSIONES

1) Los agentes ensayados (Extractos de fresno, spergularia y granada) demostraron un menor incremento de peso de los animales a partir del tercer-cuarto mes. El índice de conversión alimenticio fue menor en todos los grupos tratados.

2) Todos los grupos tratados con dichos agentes mostraron menor resistencia a la insulina y el E. fresno redujo los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada.

3) El estudio morfométrico evidenció un mayor porcentaje de islotes pancreáticos en el grupo tratado con el E. de fresno.

4) La administración de los polifenoles estudiados redujo el deterioro cognitivo de los animales, tanto a nivel bioquímico como conductual.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM et al. Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 2004; 53: 585-590.

Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002; 18(1): 75-81.

Allen KV, Frier BM, Strachan MW. The relationship between type 2 diabetes and cognitive dysfunction: longitudinal studies and their methodological limitations. *Eur J Pharmacol* 2004;490(1-3):169-75.

Anderson RA, Polansky MM. Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50:7182–7186.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr.* 2000; 130(9): 2243-50.

Arias-Díaz J, Balibrea J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr. Hosp.* 2007; 22(2):160-168

Arion J. Kennedy, Kate L. J. Ellacott, Victoria L. King, Alyssa H. Hasty. Mouse models of the metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms* 2010; 3: 156-166.

Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burer HJ, Hemmerle, H et al. Chlorogenic acid and hydroxynitrobenzaldehyde: new inhibitors of hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 339:315–322.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:79-83.

Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:137- 45.

Artico M, Di Santo R, Costi R, Novellino E, Greco G, Massa S, et al. Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *J. Med. Chem.* 1998; 41:3948-3960.

Asgary S, Naderi GA, Sarraf Zadegan N, Vakili R. The inhibitory effects of pure flavonoids on in vitro protein glycosylation. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 2002;2, 47-55.

Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001; 158:195-198.

Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition* 2004; 23:423-433.

Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient (E 0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56:1148-1157.

Awad N, Gagnon M, Messier C. The relationship between impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and cognitive function. *J Clin Exp Neuropsychol* 2004; 26(8):1044-80.

Bai N, He K, Ibarra A, Bily A, Roller M, Chen X et al. Iridoids from *Fraxinus excelsior* with adipocyte differentiation-inhibitory and PPAR-alpha activation activity. *J. Nat. Prod.* 2010; 73:2-6.

Bailey CC, Bailey OT, Leech R. Alloxan diabetes. *Proc.A,m. Diabetes Assoc.* 1946; 6: 373-393.

Bailyes EM, Shennan KIJ, Seal AJ, Smeekens SP, Steiner DF, Hutton JC et al. A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3)

has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem J.* 1992; 285.

Banting FG, Best CH. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal.* 1922; 12: 141-146.

Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J. Nutr.* 1995; 125: 777S- 783S.

Bassaganya-Riera J, Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, et al. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 777–791.

Bauduceau B, Bourdel-Marchasson I, Brocker P, Taillia H. The brain on the elderly diabetic patient. *Diabetes Metab* 2005; 31(2)5S92-5S97.

Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3248S-54S.

Bekir J, Mars M, Souchard JP, Bouajila J. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55:470-5.

Beltowski J. Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003; 9:55RA-61.

Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(15): 6185-205.

Bennett DL, Bailyes EM, Nielsen E, Guest PC, Rutherford NG, Ardden SD et al. Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 15229-15236

Berkow SE, Barnard ND, Saxe GA, Ankerberg-Nobis T. Diet and survival after prostate cancer diagnosis. *Nutr Rev.* 2007; 65(9): 391- 403.

Beydoun MA, Lhotsky A, Wang Y, Dal Forno G, An Y, Metter EJ et al. Association of adiposity status and changes in early to mid-adulthood with incidence of Alzheimer disease. *Am J Epidemiology* 2008;168:1179-1185.

Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Bhutada C, Tawari S, Dixit P et al. Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2010 Oct; 94(3):293-302.

Bi S, Moran TH. Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides* 2002; 36 (2-3): 171-81.

Bielschowsky M, Bielschowsky F. A new strain of mice with hereditary obesity. *Proc Univ Otago Med Sch* 1953; 31: 29-31.

Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10:724-728.

Biessels GJ, Kerssen A, de Haan EH, Kappelle LJ. Cognitive dysfunction and diabetes: implications for primary care. *Prim Care Diabetes* 2007;1:187-93.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther.* 2001; 90:157-177.

Blanco F. Hiperhomocisteinemia asociada a múltiples enfermedades, desde la aterotrombosis al Alzheimer: ¿casualidad o causalidad?. *Clin Invest Arterioscl* 2003;15:69-72.

Bodary PF, Gu S, Shen Y, Hasty AH, Buckler JM, Eitzman DT. Recombinant Leptin promotes atherosclerosis and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25, E119-E122.

Bodary PF, Westrich RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT. Effect of Leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *JAMA* 2002; 287, 1706-1709.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 2002; 32:14-23.

Bogan JS, Lodish HF. Two compartments for insulin-stimulated exocytosis in 3T3-L1 adipocytes defined by endogenous ACRP30 and GLUT4. *J Cell Biol* 1999; 146:609-20.

Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512 (2-3): 121-34.

Bonina FP, Leotta C, Scalia G, Puglia C, Trombetta D, Tringali G et al. Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes Nutr. Metab.* 2002; 15:14–19.

Bonner-Weir S. Morphological evidence for pancreatic polarity of B-cell within the islets of Langerhans. *Diabetes* 1988; 37:616-621.

Boussetta T, Raad H, Lett eron P, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Driss F, et al. Punicic acid a conjugated linolenic acid inhibits TNF α induced neutrophil hyperactivation and protects from experimental colon inflammation in rats. *PLoS One.* 2009; 31(7):4.

Brattstr om L, Wilchen EL. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72: 315 – 323.

Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Paul G et al. Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007; 292, G518-G525.

Campfield AL, Smith F, Burn P. OB Protein, OB Receptor, and the OB Protein Pathway. *Obesity. Understanding and Treatment. Biomedical Library Series.* 1996.

Cao G, Russell RM, Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr* 1998; 128: 2383-2390.

Cao J, Hawkins E, Bozinick J, Liu X, Zhang H, Burn P, et al. A predominant role of acyl-CoA: Monoacylglycerol acyltransferase-2 in dietary fat absorption implicated by tissue distribution, subcellular localization, and up-regulation by high fat diet. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278, 1131-1136.

Cerasi E, Kaiser N, Gross DJ. From sand rats to diabetic patients: is non-insulin-dependent diabetes mellitus a disease of the beta cell? *Diabetes Metab* 1997; 23 (Supl. 2): 47-51.

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J Agric Food Chem*. 2003a; 21;51 (11):3493-501.

Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr*. 2003b; 42(1):18-28.

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003;26: 2442-50.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84 (3): 491-5.

Chen JC, Ho FM, Pei-Dawn Lee Chao, Chen CP, Jeng KC, Hsu HB, Lee St et al. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur. J. Pharmacol*. 2005; 521, 9–20.

Cheng JT, Liu IM. Stimulatory effect of caffeic acid on alpha1A-adrenoceptors to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2000; 362:122–127.

Cheyrier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:223S-229S.

Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L et al. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 1996; 271 (5251): 994-6.

Chun O K, Kim D O, Smith N, Schroeder D, Han J, Lee CY. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J Sci Food Agric.* 2005; 85(10): 1715-24.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of US adults. *J Nutr.* 2007; 137(5): 1244.

Cicconetti P, Riolo N, Priami C, et al. Risk factors for cognitive impairment. *Recenti Prog Med* 2004;95(11):535-45.

Coker L, Shumaker S. Type 2 diabetes mellitus and cognition: An understudied issue in women's health. *Journal of Psychosomatic Research* 2003; 54, 129-139.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108(12): 1875-1881.

Commenges D, Scotet V, Renaud S. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.* 2000; 16, 357–363.

Comuzzie AG, Funahashi T, Sonnenberg G, Martin LJ, Jacob HJ, Black AE, et al. The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4321-5.

Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Guía Farmacoterapéutica de la Diabetes Mellitus. Guía práctica. 1999; P. 61-93.

Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:8628-8632.

Craig W.J., Phytochemicals guardians of our Elath. *J. Am Diet Assoc.* 1996; 97. S199-S204.

Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009 ; 26 (8):1001-43.

Cuckierman T, Gerstein HC, Williamson JD. Cognitive decline and dementia in diabetes -systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 2005;48(12):2460-9.

Dahlman I, Arner P. Obesity and polymorphisms in genes regulating human adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 1629-41.

Dassprakash MV, Arun R, Abraham SK, Premkumar K. In vitro and in vivo evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. *Pharm Biol.* 2012;12:1523-30.

David V, Katerina V, Rodríguez-Mateos A, Catarina R, Jeremy P. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes. Nutr.* 2008; 3, 115–126

Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effect of vitamin C on Glycosylation of proteins: *Diabetes* 1992; 41, 167-173.

De Matteis R., Cinti S. Ultrastructural immunolocalization of leptin receptor in the mouse brain. *Neuroendocrinology*, 1998; 68, 412-419.

De NF, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, D'Armiento FP, Fiorito C, Ignarro LJ et al. The influence of pomegranate fruit extract in comparison to regular pomegranate juice and seed oil on nitric oxide and arterial function in obese Zucker rats. *Nitric. Oxide.* 2007; 17:50-54.

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes, metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diab Rev.* 1997; 5, 177-269.

Del Rey A, Besedovsky H. Antidiabetic effects of interleukin1. *PNAS,* 1989; 86, 5943-5947.

Del Río, J. A., Gómez, P., Baidez, A. G., Arcas, M. C., Botia, J. M., Ortuno, A. Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(7): 1913-17.

Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003;148:293-300.

Dimitrakoudis D, Vranic M, Klip A. Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: Use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992; 3:1078–1091.

Dou JT, Chen M, Dufour F, et al. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem* 2005;12(6):646-55.

Dulcich MS, Hartman RE. Pomegranate Supplementation Improves Affective and Motor Behavior in Mice after Radiation Exposure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2013 (2013), Article ID 940830, 8 pages.

Dumery L, Bourdel F, Soussan Y, Fialkowsy A, Viale S, Nicolas P, Reboud-Ravaux M. Pathol. Beta-Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Biol.* 2001, 49, (1):72-85.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-1428.

Eckel RH. The complex metabolic mechanisms relating obesity

to hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; 31(9):1946-8.

Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi M, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J. Ethnopharmacol.* 2002; 82:97-103.

Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Michel JB. *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 99:49-54.

Eddouks M, Maghrani M. Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94:149-154.

Eddouks M. L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 2007; 5:194-203.

Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; 131: 872-837.

Esmailzadeh A, Tahbaz F, Gaieni I, Alavi-Majd H, Azadbakht L. Concentrated pomegranate juice improves lipid profiles in diabetic patients with hyperlipidemia. *J. Med. Food* 2004; 7:305-308.

Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry* 2007; 68:2986-3008.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1084-1089.

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DI, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison. *Principios de Medicina interna. Volumen II.* 17ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana S.A. de C.V. México. 2009. Capítulo 338 Diabetes mellitus.

Fawcett W. *Tratado de histología.* 11ª edición. Ed: Interamericana,

McGraw-Hill. 1993. Madrid, España. Capítulo 28.

Figuerola D. Diabetes. 4ª edición. Ed: Masson 2003.

Fiorentini D, Hakim G, Bonsi L, Bagnara GP, Maraldi T, Landi L. Acute regulation of glucose transport in a human megakaryocytic cell line: difference between growth factors and H(2)O(2). *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31:923–931.

Fonseca V, Suba SC, Fink LM. Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocrine reviews.* 199; 20: 738 – 759.

Forloni G, Lucca E, Angeretti N, Torre PD, Salmona MJ. Amidation of beta-amyloid peptide strongly reduced the amyloidogenic activity without alteration of the neurotoxicity. *Neurochem.* 1997; 69, 2048-2054.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4):2005-2010.

Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice polyphenols increase recombinant paraoxonase-1 binding to high-density lipoprotein: studies in vitro and in diabetic patients. *Nutrition.* 2010; 26:359-366.

García C, Arias-Díaz J, Villa N, Trueba V, Balibrea JL, Vara E. Islets from neonatally streptozotocin treated rats display an increased in vitro sensitivity to tumour necrosis factor. *Diabetología* 1994; 37 (Supl. 1): A96

García-Closas R, González CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* 1999; 10(1): 71-75

Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson S E, *et al.* Flavonoid intake and ovarian cancer risk in

a population-based case-control study. *Int J Cancer*. 2009; 124(8): 1918-25.

Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT. Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* 2000; 130:2765–2771.

Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 2000; 48.

Giménez F, Benito R. *Del Papiro de Ebers a nuestros días. Hitos de la diabetes.* Ed Europubli. 2003.

Girousse A, Tavernier G, Valle C, Moro C, Mejhert N, Dinel AL, et al. Partial inhibition of adipose tissue lipolysis improves glucose metabolism and insulin sensitivity without alteration of fat mass. *PLoS Biol.* 2013;11(2).

Glanz K, Rimer BK, Marcus FL. The scope of health behavior and health education. En K. Glanz, B. K. Rimer & F. L. Marcus (Eds.), *Health behavior and health education* (pp. 3-21). EE. UU.: Jossey-Bass. 2002.

Goldfine AB, Kahn CR. Adiponectin: linking the fat cell to insulin sensitivity. *Lancet* 2003; 362:1431-2.

Goldner MG, Gomori G. Further studies on the mechanism of alloxan diabetes, pancreatectomy and alloxan. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1947; 65(1): 18-21.

Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(10): 1072-84.

Gray AM, Flatt PR. Nature's own pharmacy: The diabetes perspective. *Proc. Nutr. Soc.* 1997; 56:507–517.

Griffen SC, Wang J, German MS. A genetic defect in beta-cell gene

expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes* 2001; 50 (1): 63-8.

Guo C, Wei J, Yang J, Xu J, Pang W, Jiang Y. Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects. *Nutr. Res.* 2008; 28:72-77.

Haataja L. Islet Amyloid in type 2 diabetes and the toxic oligomer hypotheses. *Endoc Rev.* 2008;29:303-316.

Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 1102-1107.

Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolics extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Elsevier* 2009; 23: 421-432.

Hanley AJG, Connelly PW, Harris SB, Zinman B. Adiponectin in a native Canadian population experiencing rapid epidemiological transition. *Diabetes Care* 2003; 26:3219-25.

Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2002;51:536-40.

Havel PJ. Update on adipocyte hormones. Regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004;53:S143-51.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 2002; 96(2-3): 67-202.

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Bucina R, Fidanza F. Flavonoid intake in long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch. Intern. Med.* 155: 381-386. 1995.

Hillman GG, Forman JD, Kucuk O, Yudelev M, Maughan RL, Rubio J, et al. Genistein potentiates the radiation effect on prostate carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7(2): 382-90.

Hirakura Y, Satoh Y, Hirashima N, Suzuki T, Kagan BL, Kirino Y. Membrane perturbation by the neurotoxic Alzheimer amyloid fragment beta 25-35 requires aggregation and beta-sheet formation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998, 46, 787-794.

Hocman G. Prevention of cancer: vegetables and plants. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989 93B: 201-212.

Hollebeeck S, Winand J, Hérent MF, During A, Leclercq J, Larondelle Y, Schneider YJ. Anti-inflammatory effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) husk ellagitannins in Caco-2 cells, an in vitro model of human intestine. *Food Funct.* 2012;3 (8):875-85.

Holst L, Nordeng H, Haavik S. Use of herbal drugs during early pregnancy in relation to maternal characteristics and pregnancy outcome. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2008; 17:151-159.

Holstad M, Sandler S. A transcriptional inhibitor of TNF-alpha prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. *J Autoimmun* 2001; 16 (4): 441-7.

Hontecillas R, O'Shea M, Einerhand A, Diguardo M, Bassaganya-Riera J. Activation of PPAR gamma and alpha by Punicic acid ameliorates glucose tolerance and suppresses obesity-related inflammation. *J. Am. Coll. Nutr.* 2009; 28: 184–195.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995; 95:2409-2415.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1595-1599.

Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC et al. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50: 1126-1133.

Hotta K, Gustafson TA, Yoshioka S, Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC. Relationships of PPARgamma and PPARgamma2 mRNA levels to obesity, diabetes and hyperinsulinaemia in rhesus monkeys. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 22: 1000-1010.

Hsu CL, Yen GC. Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52:53-61.

Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta. Med.* 2000; 66:228–230.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996; 271:10697-703.

Hu FB, Doria A, Li T, Meigs JB, Liu S, Memisoglu A. Genetic variation at the adiponectin locus and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes* 2004;53:209-13.

Huber JD. Diabetes, cognitive function, and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 2008;14:1594-600.

Hussain T, Gupta S, Adhami VM, Mukhtar H. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer* 2005; 113:660-669.

Ibarra A, Bai N, He K, Bily A, Cases J, Roller M, Sang S. Fraxinus excelsior seed extract FraxiPure™ limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice. *Phytomedicine*. 2011 Apr 15;18 (6):479-85.

Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de NF, Napoli C. Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric. Oxide*. 2006; 15:93-102.

Imagawa A, Funahashi T, Nakamura T, Moriwaki M, Tanaka S, Nishizawa H, et al. Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 1665-1666.

Ishida K, Mizuno A, Sano T, Noma Y, Shima K. Effect of timely insulin administration on pancreatic B-cells of Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty (OLETF) strain rats. An animal model of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Horm Metab Res* 1995; 27 (9): 398-402.

Jacobson A, Samson J, Weigner K, Ryan CM. Diabetes, the brain and behavior: Is there a biological mechanism underlying the association between diabetes and depression? *International Review of Neurobiology*, 2002; 51, 455-479.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993, 32, 4693-4697.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidante effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2009; 57, 8798-8804.

Joh Y-G, Kim S-J, Christie WW. The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii*. *JAOCS* 1995; 72, 1037–1042.

Johannot L, Somerset SM. Age-related variations in flavonoid

intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr.* 2006; 9(08): 1045-54.

Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 78:728–733.

Jouad H, Eddouks M, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B. Hypoglycaemic effect of *Spergularia purpurea* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 71:169-177.

Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, Hilaly JEI, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharmacol.* 2001a; 77.

Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Eddouks M. Chronic diuretic effect of the water extract of *Spergularia purpurea* in normal rats. *J. Ethnopharmacol.* 2001b; 75:219-223.

Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 2001c; 76:159-163.

Jouad H, Lemhadri A, Maghrani M, Zeggwagh NA, Eddouks M. Cholesterol-lowering activity of the aqueous extract of *Spergularia purpurea* in normal and recent-onset diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 87.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-92.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 2008; 582: 74-80.

Kadowaki T., Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26 (3):439- 451.

Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 3954-3962.

Kahn C., Ronald; Weir G.C. et al. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14^a Ed. Barcelona. Wolters Kluwer. 2006.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Fifth Edition. Ed. Academic Press. San Diego, California. 1997.

Kappelle AC, Biessels G, Van Buren T, Erkelens DJ, De Wildt DJ, Gispen WH. (1993). Effects of nimodipine on sciatic nerve blood flow and vasa nervorum responsiveness in diabetic rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 250, 43.

Kappelle AC, Biessels G, Branvenboer B, Van Buren T, Traber J, De Wildt DJ, et al. Beneficial effect of the Ca²⁺ antagonist, nimodipine, on existing diabetic neuropathy in the BB/Wor rat. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 111, 887.

Kapur S, Picard F, Perreault M, Deshaies Y, Marette A. Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:S36-S40.

Karasu C, Cumaoglu A, Gürpınar AR, Kartal M, Kovacicova L, Milackova I et al. Aldose reductase inhibitory activity and antioxidant capacity of pomegranate extracts. *Interdiscip Toxicol.* 2012;5 (1):15-20

Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, Ma G, Khan SI, Ferreira D. Colon cancer chemopreventive activities of pomegranate ellagitannins and urolithins. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:2180-2187.

Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, Thornton C, Willett KL, Ferreira D. Effects of pomegranate chemical constituents/intestinal

microbial metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 prostate cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57:10636-10644.

Kato A, Minoshima Y, Yamamoyo J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ. Protective Effects of Dietary Chamomile Tea on Diabetic Complications. *J Agric Food Chem* 2008; 56:8206-8211.

Kaufman M, Wiesman Z. Pomegranate oil analysis with emphasis on MALDI-TOF/MS triacylglycerol fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55, 10405– 10413.

Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992; 41 (11): 1422-8.

Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 2003; 52: 1779-1785.

Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E745-E751.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995b; 95:2111-9.

Khan GN, Gorin MA, Rosenthal D, Pan Q, Bao LW, Wu ZF, et al. Pomegranate fruit extract impairs invasion and motility in human breast cancer. *Integr. Cancer Ther.* 2009; 8:242-253.

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004a; 96(3): 229-45.

Kim JH, Cho YH, Park SM, Lee KE, Lee JJ, Lee B, et al. Antioxidants and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 expression from leaves

of *Zostera marina* L. *Arch Pharm Res.* 2004b; 27(2): 177-83.

Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Antidiabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006; 104, 119-123/.

Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 1996; 312(7029): 478-81.

Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76(3): 560.

Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocr Rev* 2008;29:494-511.

Koistinen HA, Bastard JP, Dusserre E, Ebeling P, Zegari N, Andreelli F, et al. Subcutaneous adipose tissue expression of tumour necrosis factor-alpha is not associated with whole body insulin resistance in obese nondiabetic or in type-2 diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 302-10.

Kosmiski L, Kuritzkes D, Lichtenstein K, Eckel R. Adipocyte-derived hormone levels in HIV lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003; 8: 9-15.

Kouta Y, Sakurai T, Yokono K. Cognitive dysfunction and dementia associated with elderly diabetes. *Nippon Rinsho* 2006;64(1):119-23.

Kris-Etherton PM, Keen CL. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:41-1349.

Kumar V, Abba AK, Fausto N, Mitchell RN. *Robbins Patología Humana*. Octava edición. Ed: Elsevier Saunders; 2008. Barcelona, España.

Kunkel G. *Plants for Human Consumption*. 1 ed. Koenigstein. 1984.

Landstrom AH, Westman J, Borg LA. Lysosomes and pancreatic islet function. Time course of insulin biosynthesis, insulin secretion y lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration. *Diabetes* 1988; 37: 309-316.

Langley P. Why a pomegranate? *BMJ* 2000; 321:1153-1154.

Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Espin JC, Tomas-Barberan FA. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.* 2010; 31:513-539.

Lash JM, Sherman WM, Hamlin RL. Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats. *Diabetes* 1989; 38 (7): 854-60.

Latarjet M, Ruiz Liard A. Anatomía humana. Volumen 2. 4ª edición. Ed: Panamericana. Madrid, España. 2005. Capítulo 111 Páncreas.

Launer LJ. Diabetes and brain aging: epidemiologic evidence. *Curr Diab Rep* 2005;5(1):59-63.

Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, et al. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes* 1999; 48, 176-181.

Lehay JL. Increased Proinsulin/Insulinratio in páncreas extracts of hiperglycemicrats. *Diabetes* 1993; 42:22-27.

Letenneur L, Proust-Lima C, Le Gouge A, Dartigues JF, Barberger-Gateau P. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *Am J Epidemiol.* 2007; 165(12): 1364-71.

Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry* 2006; 96:254-260.

Liang XC, Guo SS, Hagino N. Current status of clinical and experimental researches on cognitive impairment in diabetes. *Chin J Integr Med* 2006;12(1):68-74.

Like AA, Lavine RL, Poffenbarger PL, Chick WL. Studies in the

diabetic mutant mouse. VI. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. *Am J Pathol* 1972; 66 (2): 193-224.

Linde S, Nielsen J, Hansen B, Welinder B. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analyses of insulin biosynthesis in isolated rat and mouse islets. *J Chromatogr.* 1989; 462:243-254.

Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataran- ni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the PIMA Indian population. *Lancet* 2002; 360:57-58.

Liu IM, Hsu FL, Chen CF, Cheng JT. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 129:631–636.

Luo Y, Smith JV, Paramasivam V. Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99, 12197–12202

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagenlike factor, apM1 (Adipose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221:286-9.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ ACRP30. *Nat Med* 2002;8:731-7.

Maghrani M, Zeggwagh N, Lemhadri A, El Amraoui M, Michel J, Eddouks M. Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 91.

Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2005; 102:14813-14818.

Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. *Cell Cycle* 2006; 5:371-373.

Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:77-84.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5): 727-47.

Manschot SM, Biessel GJ, de Valk H, et al. Metabolic and vascular determinants of impaired cognitive performance and abnormalities on brain magnetic resonance imaging in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:2388-97.

Manuel y Keenoy B, Vertommen J, De Leeuw I. The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients. *Diabetes Nutr. Metab.*, 1999; 12:256–263.

Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 1995; 2:137–189.

Maronpot RR. Pathology of the Mouse, 1ª Edición. Ed. Cache River Press. Sain Louis, USA. 1999. Capítulo 8 Páncreas.

Marquie G, Hadjiisky P, Arnaud O, Duhault J. Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 1991; 90 (6A): 55S-61S.

Matsui T, Ebuchi S, Kobayashi M, Fukui K, Sugita K, Terahara N, et al. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50:7244–7248.

Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigaki A, Iwashina H, Hara Y. Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1993; 57:525–527.

Matsushita K, Ishikawa T, Sumita S, Kobayashi T, Ogawa H, Inoue N, et al. Comparison of circulating adiponectin and proinflammatory markers regarding their association with metabolic syndrome in

Japanese men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:871-876.

Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:29-33.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.

Mazza. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesados. Zaragoza, Acribia, 2000.

McCourt HJ, Hunter SJ, Cardwell CR, Young IS, Murray LJ, Boreham CA et al. Adiponectin multimers, body weight and markers of cardiovascular risk in adolescence: Northern Ireland Young Hearts Project. *Int J Obes (Lond)*. 2013 Jan 15. doi: 10.1038/ijo.2012.214.

Mensah-Brown EP, Stosic Grujicic S, Maksimovic D, Jasima A, Shahin A, Lukic ML. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Mol Immunol* 2002; 38 (12-13):941-6.

Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H. Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54:8956-8961.

Messier C. Impact of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes on cognitive aging. *Neurobiol Aging* 2005;26(suppl 1):26-30.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4196-200.

Mohan M, Waghulde H, Kasture S. Effect of Pomegranate Juice on Angiotensin II-Induced Hypertension in Diabetic Wistar Rats.

Phytotherapy Research 2010; 24:S196-S203.

Moore Keith L. Anatomía con orientación clínica. 3ª edición. Ed: Panamericana. Madrid, España. 1993. Capítulo 2 El abdomen.

Moorhouse JA, Carter SA, Doupe J. Vascular responses in diabetic peripheral neuropathy. Br. Med. J., 1966; 1, 883-88.

Mora H., Aragón N., Ospina G. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estrestozotocina. Vitae, Vol. 16, Núm. 3; septiembre, 2009; 311-319. Antioquia, Colombia.

Motoshima H, Wu X, Sinha MK, Hardy VE, Rosato EL, Barbot DJ, et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 5662-5667.

Moya-Camarena, S.Y., Van den Heuvel, J.P., Belury, M.A. Conjugated linoleic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta subtypes but does not induce hepatic peroxisome proliferation in Sprague–Dawley rats. Biochim. Biophys. 1999; 1436: 331–342.

Muller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. Immunobiology 2002; 205 (1):35-50.

Muller S, Cleary MP. Glucose metabolism in isolated adipocytes from ad Libitum- and restricted-fed lean and obese Zucker rats at two different ages. Proc Soc Exp Biol Med 1988; 187 (4): 398-407.

Naasani I, Oh-Hashi F, Oh-Hara T, Feng WY, Johnston J, Chan K, et al. Blocking telomerase by dietary polyphenol is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Res 2003; 63:824-830.

Naismith DJ, Akinyanju PA, Szanto S, Yudkin J. The effect, in volunteers, of coffee and decaffeinated coffee on blood glucose, insulin, plasma lipids and some factors involved in blood clotting.

Nutr. Metab., 1907; 12:144–151.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita T. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996; 20:803-12.

Neumann KF, Rojo L, Navarrete LP, et al. Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links and clinical implications. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:438-47.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.

Ning Y., Zhen W., Fu Z., Jiang J., Liu D., Belardinelli L., Dhalla A.K. Ranolazine increases β -cell survival and improves glucose homeostasis in low dose STZ-induced diabetes in mice. Department of Biology (Y.N., J.J, L.B., A.K.D.), CVTA , Gilead Palo Alto, 1651 Page Mill Rd, Palo Alto, CA 94304; Department of Human Nutrition (W.Z., Z.F., D.L.), Foods and Exercise, Virginia Tech, 1880 Pratt Drive, 1120B Building XV, Blacksburg, VA 24060. Published on January 12, 2011.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Schwartz MW. Intracellular signaling: Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001; 413:794-795.

Nygaard O, Vollest SO, Refsum H, Brattstrom L, Ueland PM. Total homocysteine and vascular disease. *J of Int Med*. 1999; 246: 425 – 454.

O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res* 2004; 551:245- 54.

Ohno T, Kato N, Ishii C, Shimizu M, Ito Y, Tomono S, et al. Genistein augments cyclic adenosine 3' 5' - monophosphate(cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. *Endocr. Res.*, 1993; 19:273–285.

Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002; 26;106 (22):2767-2770.

Okubo M, Watanate H. Reduced prevalence of diabetes according to 1997 American Diabetes criteria. *Diabetologia* 1999; 42: 1168-1170.

Omova LI, Shode FO, Ramnanan P, Nadar A. Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *Africana* leaves. *J Ethnopharmacol.* 2003;84:299–305).

Ortuño A, Báidez A, Gómez P, Arcas MC, Porras I, García-Lidón A, et al. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* 2006; 98(2): 351-58.

Ortuño G, Martínez FJ, Pastor FA, Blasco PD. Lecciones de anatomía patológica para estudiantes de medicina y odontología. Tercera edición. Ed: Diego Marin. Murcia, España. 2005. Lección 5.

Ott A, et al. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study *Neurology* 1999;53:1937-1942.

Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 561-6.

Pantuck A.J., J.T.Leppert, N.Zomorodian, W.Aronson, J.Hong, R.J.Barnard, et al. Phase II study of pomegranate juice for men with rising prostate-specific antigen following surgery or radiation for prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12:4018-4026.

Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG. Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46:2728-2735.

Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention:

progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007; 30(1): 233-45.

Peters A, Schwieger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns KM, Conrad M, et al. The selfish brain: Competition for energy resources. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2004; 28, 143-180.

Peumery JJ. Historia ilustrada de la Diabetes: de la antigüedad a nuestros días. Madrid. Medicom, S.A.. 1993.

Peungvicha P, Thirawarapan SS, Watanabe H. Possible mechanism of hypoglycemic effect of 4-hydroxybenzoic acid, a constituent of *Pandanus odoratus* root. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1998; 78:395-398.

Pickup JC, Williams G. Textbook of diabetes, 2nd. edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. 1997.

Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology (Bethesda, Md)* 2005; 20:152-61.

Pocock G, Richards CG. Fisiología Humana. La base de la Medicina. Ed. Masson, Barcelona, España. 2002.

Polagruto JA, Schramm DD, Wang-Polagruto JF, Lee L, Keen CL. Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with ex vivo platelet function. *J. Med. Food* 2003; 6:301-308.

Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete Metab* 1989; 15 (2): 61-75.

Qiao QW, Lyn PL, Hibberd P, et al. Executive dysfunction in homebound older people with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc* 2006;54(3):496-501.

Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E. Homocysteine, folate, and vitamin B12 in mild cognitive impairment, alzheimer disease,

and vascular dementia. *Am J Clin Nutr* 2004;80:114-22.

Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem pharmacol* 2006;72:1439-1452.

Ranheim T, Haugen F, Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Drevon CA. Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004; 83: 341-347.

Razay G, et al. The metabolic syndrome and Alzheimers' disease. *Arch Neurol* 2007;64:93-96.

Reifsnyder PC, Churchill G, Leiter EH. Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice. *Genome Res* 2000; 10 (10): 1568-78.

Retnakaran R, Hanley AJG, Raif N, Connelly PW, Sermer M, Zinman B. Reduced adiponectin concentration in women with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:799-800.

Rock W, Rosenblat M, Miller-Lotan R, Levy AP, Elias M, Aviram M. Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56:8704-8713.

Rodgers KE, Ellefson DD, Espinoza T, Hsu Y-h, diZerega GS, Mehrian-Shai R. Expression of intracellular filament, collagen, and collagenase genes in diabetic and normal skin after injury. *Wound Rep Reg.*, 2006; 14, 298-305.

Rosmond R. Association studies of genetic polymorphisms in central obesity: a critical review. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 1141-51.

Rotella CM, Pala L, Mannucci E. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and metabolic diseases. *J Endocrinol. Invest* 2005; 28:746-75.

Rozenberg O, Howell A, Aviram M. Pomegranate juice sugar fraction reduces macrophage oxidative state, whereas white grape

juice sugar fraction increases it. *Atherosclerosis* 2006; 188:68-76.

Rozman C, Farreras Valentí P. *Medicina interna. Volumen II. 13ª Edición.* Ed. Mosby-Doyma Libros. Madrid, España. 1995.

Ryden M, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha in human adipose tissue: from signalling mechanisms to clinical implications. *J Intern Med* 2007; 262: 431-8.

Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol.* 2003; 65:773-781.

Sánchez-Recalde Á, Kaski JC. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev Esp Cardiol* 2001;54: 751-63.

Sassano G, Sanderson P, Franx J, Groot P, Van Straalen J, Bassaganya-Riera J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. *J. Sci. Food Agric.* 2009; 89 (6): 1046–1052.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45:287-306.

Schadewaldt H. *Historia de la diabetes mellitus.* Ed: Farbwerke Hoechst AG, Alemania. 1975.

Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001; 382:1687-96.

Schiel G., Corsaro C, Scalia M, De Bilio AJ, Bonomo RP. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂. *Free Rad. Biol. Med.* 1991; 11: 1-8.

Schreyer SA, Chua SC Jr, LeBoeuf RC. Obesity and diabetes in TNF-alpha receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 402-11.

Schwartz GJ, Whitney A, Skoglund C, Castonguay TW, Moran TH. Decreased responsiveness to dietary fat in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats lacking CCK-A receptors. *Am J Physiol* 1999; 277 (4 Pt 2): R1144-51.

Seeram NP, Lee R, Heber D. Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clin Chim Acta* 2004; 348.

Seeram NP, Zhang Y, McKeever R, Henning SM, Lee RP, Suchard MA et al. Pomegranate juice and extracts provide similar levels of plasma and urinary ellagitannin metabolites in human subjects. *J. Med. Food* 2008; 11:390-394.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques P. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-83.

Shabrova EV, Tarnopolsky O, Singh AP, Plutzky J, Vorsa N, et al. Insights into the Molecular Mechanisms of the Anti-Atherogenic Actions of Flavonoids in Normal and Obese Mice. *PLoS One*. 2011;6 (10):e24634.

Shanmugam K, Holmquist L, Steele M, Stuchbury G, Berbaum K, Schulz O, et al. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008 (52), 000 – 000

Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284 (6): F1138-44.

Shima K, Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, Noma Y. Exercise training has a long-lasting effect on prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats. *Metabolism* 1996; 45 (4): 475-80.

Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry*, 1992; 31:8059–

8063.

Sima AA, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia and central nervous system. *Eur J Pharmacol* 2004;490(1- 3):187-97.

Sinclair AJ, Girling AJ, Bayer AJ. Cognitive dysfunction in older subjects with diabetes mellitus: Impact on diabetes self-management and use of care services. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2000; 50, 203-212.

Sinclair AJ, Girling AJ, Gray L, Lunec J, Barnett AH. An investigation of the relationship between free radical activity and vitamin C metabolism in elderly diabetic subjects with retinopathy. *Gerontology* 1992; 38, 268-274.

Singh I, Carey AL, Watson N, Febbraio MA, Hawly JA. Oxidative stress-induced insulin resistance in skeletal muscle cells is ameliorated by gamma-tocopherol treatment. *Eur J Nutr* 2008; 47:387-392.

Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96, 11049-11053.

Slack JMw. Developmental biology of the páncreas. *Development* 1995; 121, 1569-1580.

Smart RC, Huang MT, Chang RL, Sayer JM, Jerina DM, Wood AW, et al. Disposition of the naturally occurring antimutagenic plant phenol, ellagic acid, and its synthetic derivatives, 3-O-decylellagic acid and 3,3'-di-O-methylellagic acid in mice. *Carcinogenesis* 7. 1986; (10):1663-7.

Smith U, Axelsen M, Carvalho E, Eliasson B, Jansson PA, Wesslau C. Insulin signalling and action in fat cells: associations with insulin resistance and type 2 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 1999;892:119-26.

Snehalatha C, Mukesh B, Simon M, Viswanathan V, Haffner SM, Ramachandran A. Plasma adiponectin is an independent predictor of

type 2 diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 2003; 26:3226-9.

Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer*. 2008; 60(4): 442-49.

Spalteholz W. Atlas de anatomía humana. Tomo tercero. 2ª edición. Ed: Labor, S.A. Barcelona-Madrid, España. 1963.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2003; 361: 226-228.

Starr VL, Convit A. Diabetes, sugar-coated but harmful to the brain. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:638-42.

Steen E, et al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease. Is this type 3 diabetes? *J. Alzheimer Dis* 2005;7:63-80.

Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al. Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 2003;26:3315-9.

Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals—just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(22): 2900-16.

Stine Wb, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *Biol. Chem*. 2003; 278, 11612-11622.

Strachan MWJ, Deary IJ, Ewing FME, Frier BM. Is type two (non insulin dependent) diabetes mellitus associated with an increased risk of cognitive dysfunction? *Diabetes Care*, 1997; 20, 438-445.

Strowski MZ, Cashen DE, Birzin ET, Yang L, Singh V, Jack TM et al. Antidiabetic activity of a highly potent and selective nonpeptide Somatostatin Receptor subtype-2 agonist. *Endocrinology*, 2006; 147, 4664-4673.

Stumvoll M, Tschritter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser

M, et al. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:37-41.

Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Marlin R, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 2005; 96:810-814.

Sun CL, Yuan JM, Lee MJ, Yang CS, Gao YT, Ross RK, et al. Urinary tea polyphenols in relation to gastric and esophageal cancers: a prospective study of men in Shanghai, China. *Carcinogenesis.* 2002; 23(9): 1497-503.

Suresh Babu P, Srinivasan K. Amelioration of renal lesions associated with diabetes by dietary curcumin in streptozotocin diabetic rats. *Mol. Cell Biochem.*, 1998; 181:87–96.

Surmi BK, Hasty AH. Macrophage infiltration into adipose tissue: initiation, propagation and remodeling. *Future Lipidol* 2008; 3: 545-56.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372(6502):182-6.

Teel RW, Martin RM. Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. *Xenobiotica* 1988; 18(4):397-405.

Terrettaz J, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats. *Endocrinology* 1986; 118 (2): 674-8.

Tesauro M, Mascali A, Franzese O, Cipriani S, Cardillo C, Di Daniele N. Chronic kidney disease, obesity, and hypertension: the role of leptin and adiponectin. *Int J Hypertens.* 2012, 2012: 943605.

Trombold JR, Barnes JN, Critchley L, Coyle EF. Ellagitannin consumption improves strength recovery 2-3 d after eccentric

exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2010; 42:493-498.

Trudeau F, Gagnon S, Massicotte G. Hippocampal synaptic plasticity and glutamate receptor regulation: influences of diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004;490(1-3):177-186.

Tseng BP, Esler, WP, Clish, CB, Stimson ER, Ghilardi Jr, Vinters Hv et al. Deposition of monomeric, not oligomeric, Abeta mediates growth of Alzheimer's disease amyloid plaques in human brain preparations. *Biochemistry* 1999; 38, 10424-10431.

Un .Food and Agriculture Organization. *FAO Yearbook Production*. Rome. 1995;48:118–119

Unger RH. Diabetic Hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 1991; 251:1200-5.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-4.

Van Dam RM, Feskens EJ. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*, 2002; 360:1477–1478.

Vasselli JR. Patterns of hyperphagia in the Zucker obese rat: a role for fat cell size and number? *Brain Res Bull* 1985; 14:633-641.

Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C, Froguel P. The genetics of adiponectin. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 151-158.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46:4113-4117.

Venables MC, Hulston CJ, Cox HR, Jeukendrup AE. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(3):778-84.

Vera JC, Reyes AM, Carcamo JG, Velasquez FV, Rivas CI, Zhang RH, et al. Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J. Biol.*

Chem., 1996; 271:8719– 8724.

Veroni MC, Proietto J, Larkins RG. Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes* 1991; 40 (11): 1480-7.

Vijas S, Hofer TP, Hayward RA. Estimated benefits of glycemic control in microvascular complications in type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 1997; 127: 788-795.

Visen,P., B.Saraswat, A.Visen, M.Roller, A.Bily, C.Mermet, et al. Acute effects of *Fraxinus excelsior* L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 126:226-232.

Von Hoosier G, The age of biology: opportunities and challenges for Laboratory Animal Medicine. *Scand J Lab Anim Sci* 1999; 26 (4): 176-184.

Vroegrijk IO, van Diepen JA, van den Berg S, Westbroek I, Keizer H, Gambelli L, et al. Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49 (6):1426-30.

Walsh DM, Klubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* 2002, 30, 552-557.

Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:34933–34940.

Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring JE, Sesso HD. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(3): 905-12.

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

Welsch CA, Lachance PA, Wasserman BP. Effects of native and oxidized phenolic compounds on sucrase activity in rat brush border membrane vesicles. *J. Nutr.*, 1989; 119:1737–1740.

Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, Hyden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3881- 3885.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1930-1935.

Whitley AC, Stoner GD, Darby MV, Walle T. Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid -extensive binding to protein and DNA. *Biochem Pharmacol* 2003; 66.

Wilding JP. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2007; 24: 934-45.

Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxid Redox Signa.* 2001; 3:1009-1021.

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391(6670):900-4.

Wright CI, Van-Buren L, Kroner CI, Koning MMG. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 114:1-31.

Yamauchi T, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Froguel P, et al. Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2003b 3(4):243-254. Review.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003a;423:762-9.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8(11):1288-95.

Yang Z, Chen M, Fialkow LB, Ellet JD, Wu R, Nadler JL. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. *Páncreas* 2003; 26(4): e99-104.

Youdim KA, Joseph JA. A posible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunction: a multiplicity of effects. *Free. Radic. Biol. Med.* 2001; 30, 583–594

Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, et al. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 2002 (51): 2968-2974.

Zagorski MG, Yang J, Shao H, Ma K, Zeng H, Hong A. Methodological and chemical factors affecting amyloid beta peptide amyloidogenicity. *Methods Enzymol.* 1999, 309, 189-204.

Zahner D, Malaisse WJ. Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes Res* 1990; 14 (3): 101-8.

Zhang Y, Wang D, Lee RP, Henning SM, Heber D. Absence of pomegranate ellagitannins in the majority of commercial Pomegranate extracts: implications for standardization and quality control. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57:7395-7400.

Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 2004;490(1-3):71-81.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414:782-787.

Ziv E, Shafrir E, Kalman R, Galer S, Bar-On H. Changing pattern of prevalence of insulin resistance in *Psammomys obesus*, a model of nutritionally induced type 2 diabetes. *Metabolism* 1999; 48 (12): 1549-54.

Zuñiga J, Tur M, Milocco S, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. México: McGraw-Hill Interamericana, 2001; p. 682.

Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JA. Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. Ed: Secal; 2008. Universidad de Alcalá.