

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



“RESPUESTA INMUNE CELULAR Y DE CITOCINAS IL-6 Y TNF- $\alpha$  AL  
TRATAMIENTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA INFUSIÓN POR VÍA ORAL DE  
*Azadirachta indica* EN RATAS DIABÉTICAS DE TIPO 2”

TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

CARLOS URIEL LUNA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. TRINIDAD GARCÍA IGLESIAS

ASESORA DE TESIS: Dra. MARIA DEL ROSARIO HUIZAR LÓPEZ

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias,  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad informe tesis, opción tesis con el título: "**RESPUESTA INMUNE CELULAR Y DE CITOCINAS IL-6 Y TNF- $\alpha$  AL TRATAMIENTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA INFUSIÓN POR VIA ORAL DE *Azadirachta indica* EN RATAS DIABETICAS TIPO 2**" que realizó el/la pasante **Carlos Uriel Luna López** con número de código **206413633** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

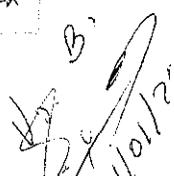
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Carlos Uriel Luna López  
 Las Agujas Nextipac, Zapopan Jalisco a 30 de enero de 2012

Firma   
 Nombre: Trinidad García Iglesias  
 Director/a del trabajo,

Firma   
 Nombre: María del Rosario Huizar López  
 Asesor(es)

Nombre completo de los Síndicales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Galina Zaitzeva Petrovna		30/01/2012
Dr. Alfonso Islas Rodríguez		30/01/2012
Dr. Jorge Peregrina Sandoval		30/01/2012
Dra. María del Rosario Huizar López Asesora		30/01/12

  
 B'  
 30/01/12



# Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología  
COORD-BIO-203/2011

C. CARLOS URIEL LUNA LÓPEZ  
PRESENTE

Manifiestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción: TESIS con el título: "RESPUESTA INMUNE CELULAR Y DE CITOCINAS IL-6 Y TNF- $\alpha$  AL TRATAMIENTO HIPOGLUCEMIANTE DE LA INFUSIÓN POR VÍA ORAL DE *Azadirachta indica* EN RATAS DIABÉTICAS TIPO 2", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la Dra. Trinidad García Iglesias y como asesor a la Dra. Rosario Huizar López..

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextoac, Zapopan, Jal., 17 de octubre, del 2011.

DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

M.C. GLOKIA PARADA SARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres Carlos Luna y Laura López por darme la mejor herencia que es el estudio, por apoyarme en todos los momentos difíciles de mi vida y de mi trayectoria académica, por ayudar a levantarme cada vez que caí y llevarme al instante que estoy viviendo, por educar con el ejemplo, darme principios, valores y formar la persona que ahora soy y porque mis logros y mi felicidad también son para ellos.**

**A mis hermanos Carlos por ser mi ejemplo a seguir y Yannick por permitirme ser , por sus consejos, regaños y motivaciones en cada momento de nuestras vidas.**

**A mi novia y prometida Nora Hernández por ser mi apoyo incondicional en cada momento de mi vida y por haber llegado a ella en el momento que mas la necesitaba y recordarme lo importante de luchar por lo que mas anhelas en la vida.**

**A mis amigos por estar conmigo en las buenas, las malas, las peores y las excelentes, por haber compartido grandes momentos de mi carrera profesional y mi vida, por creer en mí, mi amistad, mis ideas y mis pensamientos.**

**A la Dra. Trinidad García Iglesias, Dra. Teresa García Cobián, al MCP Alejandro Medina y mas Doctoras y compañeros del Laboratorio de Cardiovascular del Centro Universitario de Ciencias de la Salud por ayudarme a crecer como profesional con su apoyo incondicional en cada momento con sus sabidurías, consejos, regaños y enseñanzas.**

*`` No importa las veces que caigas, lo importante  
es levantarse con ánimo y entusiasmo y siempre luchar  
por lo que más anhelas en la vida ''*

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ANTECEDENTES</b> .....	9
<b>EPIDEMIOLOGIA</b> .....	10
<b>CLASIFICACION</b> .....	14
Diabetes mellitus tipo 1 .....	14
Diabetes mellitus tipo 2.....	14
Diabetes Gestacional.....	15
<b>DIAGNOSTICO</b> .....	15
<b>ETIOLOGIA</b> .....	16
<b>COMPLICACIONES</b> .....	17
Retinopatía diabética .....	17
Nefropatía diabética.....	18
Dislipidemias.....	18
Pie diabético .....	19
<b>OBESIDAD COMO RIESGO DE Diabetes mellitus</b> .....	20
<b>RESISTENCIA A INSULINA</b> .....	20
<b>RESPUESTA INMUNE Y Diabetes mellitus</b> .....	21
Citocinas .....	22
Il-6.....	23
TNF- $\alpha$ .....	23
<b>TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO</b> .....	24
<b>TERAPIAS ALTERNATIVAS</b> .....	24
<b>MODELOS ANIMAL</b> .....	25
<b>TERAPIAS ALTERNATIVAS</b> .....	26
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	33
<b>HIPOTESIS</b> .....	34
<b>OBJETIVO PARTICULAR</b> .....	35
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	35
<b>METODOLOGIA</b> .....	36
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	36
<b>PRIMERA ETAPA</b> .....	36
<b>SEGUNDA ETAPA</b> .....	37

PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN.....	37
CULTIVO CELULAR.....	37
ANALISIS ESTADISTICO.....	49
BIOSEGURIDAD.....	39
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>52</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>FIGURA 1</b>	Representación gráfica de Prevalencia de DM y estimación al 2030.....	11
<b>FIGURA 2</b>	Tasa de mortalidad de DM. INEGI 2010.....	12
<b>FIGURA 3</b>	Estimación en porcentaje en adultos con DM en México.....	13
<b>FIGURA 4</b>	Peso de ratas Wistar machos controles y diabéticas.....	37
<b>FIGURA 5</b>	Concentración sérica en grupos control y experimental.....	38
<b>FIGURA 6</b>	Concentración sérica entre IL-6 y TNF- $\alpha$ en grupos control y experimental.....	38
<b>FIGURA 7</b>	Datos obtenidos del registro de peso.....	39
<b>FIGURA 8</b>	Cuantificación de glucosas en sangre periférica .....	40
<b>FIGURA 9</b>	Respuesta inmune a través de IP en células mononucleares.....	41
<b>FIGURA 10</b>	Respuesta inmune a través de células esplénicas.....	42
<b>FIGURA 11</b>	Concentración de IL-6 en ratas con DM2 y tratamiento.....	42
<b>FIGURA 12</b>	Concentración de TNF- $\alpha$ en ratas con DM2 y tratamiento.....	43
<b>TABLA 1</b>	Especies de modelos experimentales y que desarrollan DM .....	26
<b>TABLA 2</b>	Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante .....	27
<b>TABLA 3</b>	Estructuras con actividad de árbol de Neem.....	31
<b>TABLA 4</b>	Concentración de Glucosas de SP por semana de tratamiento .....	40
<b>IMAGEN 1</b>	Árbol de Neem.....	30

## ABREVIATURAS

<b>ALT</b>	Alanin Amino Transferasa
<b>AST</b>	Aspartato Amino Transferasa
<b>CONAPO</b>	Consejo Nacional de Población
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>EZT</b>	Estreptozotocina
<b>FAD</b>	Federación Argentina de Diabetes
<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
<b>IP</b>	Índice de Proliferación
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PHA</b>	Fitohematoglutina
<b>RI</b>	Resistencia a Insulina
<b>SI</b>	Sistema inmune
<b>SP</b>	Sangre Periférica
<b>SS</b>	Secretaría de Salud
<b>TA</b>	Temperatura Ambiente
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RL</b>	Radicales libres
<b>EO</b>	Estrés oxidativo

## RESUMEN

La Diabetes mellitus tipo 2 es una de las enfermedades crónico-degenerativas con mayor índice de mortalidad a nivel mundial incluyendo México.<sup>(2)</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que a nivel mundial, existen 250 millones de personas con esta enfermedad y considera que más de 300 millones están en riesgo de presentarla. Factores de riesgo asociados al desarrollo de la DM2 es el estilo de vida y la obesidad, este último representa el 70% de la población adulta en México y en Jalisco, lo que explicaría en gran medida la exponencialidad en la aparición de DM. El árbol de *Azadirachta indica* mejor conocida como Neem, ha sido conocida desde hace más de 200 años por los nativos del subcontinente de la India y países del sureste de Asia por sus múltiples propiedades medicinales. Se le han otorgado efectos tales como inmunomodulador, antiinflamatorio, antiulcérico, antimalaria, antifúngico, antibacterial, antiviral, antioxidante, antimutagénico, anticarcinogénico y antihiperlipidémico. Su efecto antidiabético puede atribuirse a su actividad antiserotonérgica. Este último puede deberse a la secreción de insulina endógena por un mecanismo similar reportado de las sulfunilureas.

**Objetivo:** Evaluar la respuesta inmune celular y la expresión de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en ratas diabéticas tipo 2 expuestas a *Azadirachta indica* como tratamiento hipoglucemiante. **Material y Métodos.** Se evaluaron un total de 40 ratas de 150 gramos de peso, el estudio se realizó en dos etapas. La primera etapa para la confirmación del modelo de DM2 en ratas se sometieron a una dieta hipocalórica y se adicionó Aloxano vía intraperitoneal, se monitoreó la glucemia durante 3 semanas consecutivas y se confirmó el modelo. En la segunda etapa 15 ratas fueron divididas en 3 grupos/5 ratas por grupo y se clasificaron como: Control, DM2, DM2 +NEEM, durante 7 semanas se adicionó la infusión de *Azadirachta indica* por vía oral, se registró el peso, se cuantificó glucosa y, una vez cubierto el plazo, se evaluó la respuesta inmune celular esplénica y en células mononucleares de sangre periférica y la concentración de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ , además se cuantificaron las enzimas hepáticas AST, ALT. **Resultados.** En la primera etapa se estandarizó el modelo experimental de DM2 con Aloxano. En la segunda fase las ratas diabéticas que fueron expuestas a *Azadirachta indica*, disminuyeron el peso y los niveles de glucosa en sangre, no presentaron alteración en la concentración de enzimas hepáticas AST y ALT, mejoraron la respuesta inmune con respecto al grupo de ratas diabéticas, además disminuyó la concentración de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en el grupo con el fitofármaco. **Conclusión.** Las ratas diabéticas tratadas con *Azadirachta indica*, presentaron tendencia a disminución de glucosa en sangre, además hepatoprotección y se restauró la respuesta inmune con relación al grupo control.

## Antecedentes

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico degenerativa en la que el paciente presenta alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, de proteínas, grasas, y una relativa o absoluta deficiencia de la secreción de insulina con grados variables de resistencia a ésta. <sup>(1)</sup>

La DM es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por un defecto (completo o no) de la secreción o acción, de una hormona: la insulina. La insulina se produce en unas formaciones especiales que se encuentran en el páncreas: los islotes de Langerhans. En las personas no diabéticas los niveles de glucosa en la sangre se mantienen dentro de unos límites normales cercanos a los 130 mg/dl, incluso cuando se han tomado alimentos muy ricos en azúcares ó grasas; sin embargo, en personas diabéticas estos niveles sobrepasan los 200 mg/dl. <sup>(2)</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la diabetes como un problema de salud pública, en solo dos décadas los estudios epidemiológicos han tenido un gran impacto en la investigación, diagnóstico, atención y prevención de la diabetes, en particular se han realizado estudios en algunos grupos étnicos sobre la prevalencia, estudio que sirvió para estandarizar la metodología en el estudio de diabetes en el mundo y sobre todo para definir el punto de corte entre normal y anormal. <sup>(3)</sup>

De acuerdo con la American Diabetes Association (ADA), define la DM como un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la hiperglucemia resultante de los defectos de la secreción o la acción de la insulina, o ambas. Existen muchos procesos fisiopatogénicos involucrados en su aparición, que varían desde la destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  del páncreas hasta alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina. La base de todas las alteraciones metabólicas es la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos blanco. Esto último se debe a la secreción inadecuada de insulina o a la disminución de la respuesta tisular en alguno de los distintos puntos de la compleja vía de la hormona. <sup>(4)</sup>

La Secretaría de Salud (SS) define a DM como a un grupo de enfermedades sistémicas, crónicas, de causa desconocida, con grados variables de predisposición hereditaria y la participación de diversos factores ambientales que afectan al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas que se asocian fisiopatológicamente con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o en la acción de la insulina. Estos defectos traen como consecuencia una elevación anormal de la glucemia después de cargas estándar de glucosa e incluso en ayunas conforme existe mayor descompensación de la secreción de insulina. <sup>(5)</sup>

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), 32.4 % de la población mexicana padece obesidad. Se ha asociado de manera muy estrecha que este problema no sólo aumenta el riesgo de desarrollar DM, sino que complica su manejo. La resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa son sustratos fisiológicos que sustentan la aparición de la enfermedad. <sup>(6)</sup>

### **Epidemiología**

Actualmente la DM se distribuye por todo el mundo, aunque tiene mayor peso en los países desarrollados y en vías de desarrollo, representando un problema personal y de salud pública de enormes proporciones. Por regiones, la más afectada por la enfermedad según estas previsiones continuará siendo el sureste asiático, con 122 millones de pacientes diabéticos.; enseguida, el área del Pacífico, con 71 millones de afectados; y el continente americano, donde se espera que la enfermedad llegue a afectar a 67 millones de personas; mientras tanto, se calcula que en África rondará los 18 millones de personas, más del doble de los 7 millones actuales, y que en Europa aumentará la prevalencia actual, cifrada en 33 millones en 2000, hasta alcanzar los 48 millones de pacientes. <sup>(7)</sup>

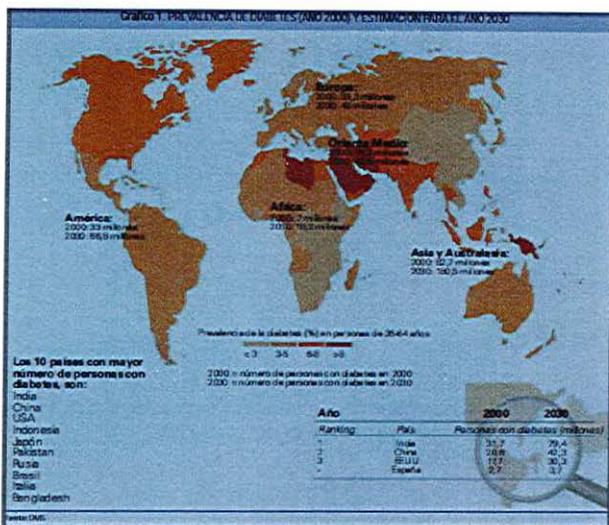


Figura 1.- Representación gráfica de la prevalencia de Diabetes Mellitus y estimación al 2030

Fuente: Diabetes Atlas, International Diabetes Federation Prevalence DM Comparisons 2003-2025

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay más de 180 millones de personas con diabetes. Se ha calculado que en 2005 hubo 1.1 millones de muertes debidas a esta enfermedad. Aproximadamente un 80% se registran en países de ingresos bajos o medios. Sin embargo se ha pronosticado que en el año 2030 la diabetes afectará a 370 millones de personas, lo que supone un aumento de un 114% con respecto a las últimas cifras publicadas por esta entidad, correspondientes al año 2000. <sup>(8)</sup>

La DM1 supone un 10% del total y, al igual que la diabetes de tipo 2, también está aumentando en prevalencia. La incidencia de la DM2 podría cifrarse en torno a 60- 150 casos nuevos por 100.000 habitantes y año, mientras que en la diabetes tipo 1 se acercaría a 10-12 casos por 100.000 habitantes. Con respecto a la mortalidad, se observa un aumento en los pacientes varones y hasta 2,6 veces más en las mujeres. Pero esto no es así a todas las edades, ya que cuanto más joven son los pacientes, el incremento de riesgo de mortalidad es aún mayor. <sup>(9)</sup>

De acuerdo a la SS (Secretaría de Salud) la diabetes se ha convertido en México en la primera causa de muerte al contribuir con 12% del total de muertes.<sup>1</sup> Se estimó para el año 2030 una prevalencia nacional de 10.9% y tan sólo en 2002 se registraron 114.6 nuevos casos por cada 100 000 habitantes.<sup>(10)</sup>

La tasa de mortalidad por DM en 2008 fue de 70.9 por cada 100 mil habitantes. Siendo los estados de Distrito Federal (99), Coahuila (87.4), Morelos (84.3), Guanajuato (82.9) y Michoacán (80.4) quienes presentan las mayores tasas de mortalidad por esta afección. Por el contrario, los estados con la menor tasa de mortalidad fueron Quintana Roo (35.7), Chiapas (45), Baja California Sur (51.3), Baja California (51.6) y Sinaloa (56.5).<sup>(11)</sup>

Tasa de mortalidad observada de diabetes mellitus por entidad federativa 2008  
Por cada 100 mil habitantes

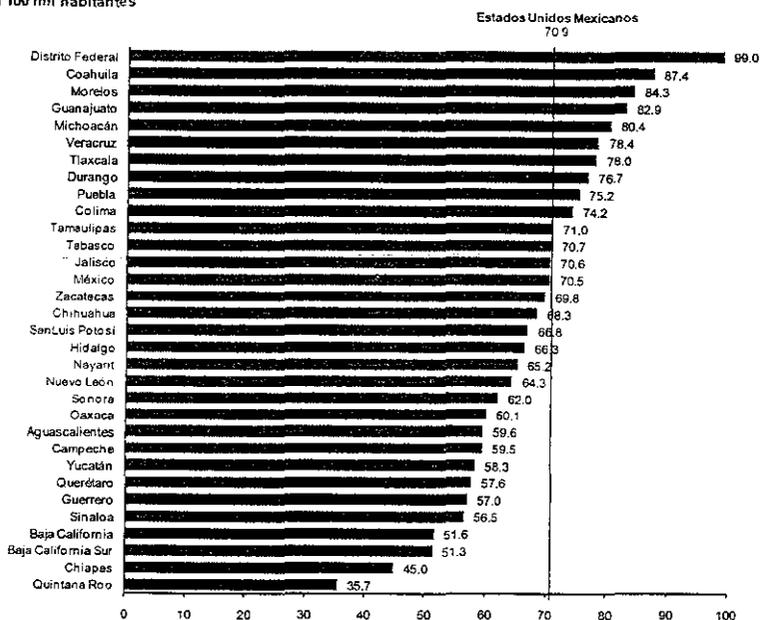


Figura 2.- Tasa de mortalidad de DM INEGI (2010). Estadística de Mortalidad y CONAPO (2010).  
Proyección de la población de México 2005-2030: Fuente INEGI

En los adultos de 20 años o más fue de 7.9%; siendo mayor en mujeres (8.5%) que en hombres (7.4%). En comparación con las prevalencias en el país, Jalisco se ubicó por arriba de la media nacional para la prevalencia y el diagnóstico médico de DM, hipertensión arterial e hipercolesterolemia. <sup>(12)</sup>

Diabetes mellitus por diagnóstico médico  
previo. Adultos de 20 años o más.  
México, ENSANUT 2006

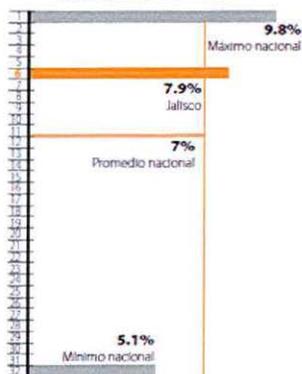


Figura 3.- Estimación en porcentaje en adultos mayores de 20 años con Diabetes Mellitus en México. Fuente (ENSANUT). 2006

## **Clasificación de Diabetes mellitus**

### **Diabetes mellitus Tipo 1**

Conocida como DM autoinmune, representa el 5% al 10% de los pacientes diabéticos y es la resultante de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreática. El 85% al 90% de estos individuos presenta uno o más tipos de autoanticuerpos al momento de la detección de la hiperglucemia en ayunas. La velocidad de destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas es variable, en algunos sujetos es rápida (bebés y niños) y algo más lenta en otros (adultos). La primera manifestación de la enfermedad, especialmente en el primer grupo, puede ser la cetoacidosis. Otros pueden presentar hiperglucemia moderada en ayunas, capaz de cambiar rápidamente a hiperglucemia grave o a cetoacidosis, en presencia de causas desencadenantes. La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  tiene múltiples factores de predisposición y también se relaciona con factores ambientales poco definidos. Algunos pacientes presentan DB1 idiopática y cursan su enfermedad con insulinopenia y propensión a la cetoacidosis, mas sin evidencias de daño autoinmune. <sup>(13)</sup>

### **Diabetes mellitus Tipo 2**

La DM2 se debe a una resistencia a la acción de la insulina y a un déficit relativo de la secreción de esta hormona. Por lo tanto, en fases iniciales, se genera una situación de hiperinsulinismo y, generalmente, hiperglucemia. Es en este momento en el que puede existir un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en diferentes receptores tisulares (macroangiopatía), pero sin causar sintomatología que permita el diagnóstico clínico. Durante este periodo asintomático es posible demostrar la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono mediante una determinación de la glucemia plasmática basal o de la realización de un test de tolerancia oral a la glucosa. Por esta situación, en la DM 2, los síntomas comienzan de forma más gradual que en la DM1. En fases tardías de la enfermedad, aparece el fracaso de la célula  $\beta$  con hipoinsulinismo e hiperglucemia. <sup>(14)</sup>

DM 2 representa un conjunto de desórdenes metabólicos caracterizados por la elevación crónica de la glucosa en sangre y la predisposición al

desarrollo de distintas complicaciones micro y macrovasculares. Desde el punto de vista genético, la DM2 es una entidad multifactorial donde participan un conjunto de genes de susceptibilidad cuya expresión es modulada por factores ambientales. <sup>(14)</sup> La disfunción de la célula pancreática productora de insulina y una respuesta disminuida a la acción de esta hormona en distintos órganos y tejidos, incluyendo el hígado son los mecanismos fisiopatológicos principales en esta patología. <sup>(15)</sup>

### **Diabetes Gestacional**

La diabetes gestacional es la intolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable, que comienza o se diagnostica por primera vez durante el embarazo. A diferencia de los otros tipos de diabetes, la gestacional no es causada por la carencia de insulina, sino por los efectos bloqueadores de las otras hormonas en la insulina producida, una condición denominada resistencia a la insulina, que se presenta generalmente a partir de las 20 semanas de gestación. La respuesta normal ante esta situación es un aumento de la secreción de insulina, cuando esto no ocurre se produce la diabetes gestacional. En muchos casos los niveles de glucosa en sangre retornan a la normalidad después del parto. Su prevalencia global se sitúa entre 1 – 3 %. Es reconocida la repercusión de la diabetes gestacional sobre el embarazo y sus efectos perinatales adversos tanto en la madre como en el feto. <sup>(16)</sup>

### **Diagnostico de DM2**

Los criterios diagnósticos actuales, según la última modificación de la ADA, por definición se considera diabético a aquella persona que cumpla los siguientes requisitos. Además se deben confirmar repitiendo la prueba en un día distinto excepto que el paciente presente una hiperglucemia con descompensación metabólica aguda: <sup>(17)</sup>

1.- Glucosa plasmática casual mayor o igual a 200 mg/dl. Hiperglucemia casual se define como la que aparece en cualquier momento del día sin considerar el tiempo desde la última comida. Los síntomas clásicos incluyen poliuria, polidipsia y pérdida inexplicable de peso. <sup>(17)</sup>

2.- Glucemia plasmática basal mayor o igual a 126 mg/dl. La glucemia plasmática basal se define como aquella que se realiza con ausencia de ingesta calórica de al menos ocho horas. <sup>(17)</sup>

3.- Resultado del test de tolerancia oral de glucosa con 75 g de glucosa mayor o igual a 200 mg/dl. El test debe realizarse según describe la OMS, utilizando 75 g de glucosa disueltos en 400 ml de agua. <sup>(17)</sup>

Los estadios previos al diagnóstico de diabetes, las cifras de glucemia basal están alteradas generalmente como resultado de un estado de insulinoresistencia inicial. Se engloban en la categoría de homeostasis alterada a la glucosa, como suelen en las personas que presentan cierto grado de obesidad, presentan un mayor riesgo para desarrollar DM, y un mayor riesgo de complicaciones macrovasculares. <sup>(17)</sup>

1.- Glucemia basal alterada: La presentan aquellos pacientes cuya glucemia está entre 100 y 125 mg/dl <sup>(17)</sup>

2.- Intolerancia a la glucosa: La presentan aquellos pacientes que, tras un test de tolerancia oral a la glucosa presentan glucemia basal inferior a 126 mg/dl y glucemia a las dos horas de la sobrecarga entre 140 y 199 mg/dl. <sup>(17)</sup>

## **Etiología Diabetes mellitus tipo 2**

El desarrollo de alteraciones del metabolismo de la glucosa, está relacionado bien sea con la deficiencia de la acción insulínica, con la secreción de dicha hormona o aparece por efecto de la combinación de las dos. La disminución de la secreción de insulina puede estar relacionada a diversas condiciones, por ejemplo la reducción de la masa total de células  $\beta$  (en caso de la extracción quirúrgica del páncreas o a consecuencia de pancreatitis aguda) o la destrucción autoinmune de dichas células, fenómeno que ocurre en la DM1. De manera adicional, algunos defectos genéticos del metabolismo de la célula  $\beta$  también pueden traducirse en una deficiente secreción de la insulina en respuesta a estímulos fisiológicos. <sup>(18)</sup>

La resistencia a la insulina (RI) bien puede estar genéticamente determinada, como es el caso de los sujetos con historia familiar de esta enfermedad, o se presenta como resultado de un exceso de hormonas de contrarregulación, o por efecto del tratamiento con medicamentos inductores de resistencia a la insulina. <sup>(18)</sup>

La DM2 exhibe tres fases bien definidas: en primer término se presenta un estado de resistencia periférica a la insulina, asociado a cifras normales de glucemia, pues hay un incremento de la producción de esta hormona; en una segunda fase, a medida que la resistencia a la acción hormonal es más prominente, la producción de insulina no es suficiente para controlar las cifras de glucosa en sangre y, en consecuencia, aparece hiperglucemia postprandial, y por último, ocurre la insuficiencia de las células  $\beta$  y disminuye la síntesis de insulina, de modo que aparece hiperglucemia en ayuno. <sup>(18)</sup>

### **Complicaciones de DM2**

El tener DM2 aumenta el riesgo de desarrollar varias complicaciones serias como: retinopatía diabética, nefropatía diabética, neuropatía diabética con sus múltiples manifestaciones, alteraciones metabólicas asociadas como las dislipidemias, complicaciones de etiología mixta úlceras, pie diabético e inmunosupresión principalmente. <sup>(19)</sup>

#### **Retinopatía diabética**

Es una complicación de la DM2 que desarrollan en cierto grado la mayoría de los pacientes con DM2. Así mismo, es importante resaltar que se trata de una enfermedad progresiva, agresiva y mutilante: Las lesiones suelen aparecer a partir de los 10 años del diagnóstico de la diabetes tipo I, mientras que en los pacientes con diabetes 2 hay lesiones visibles en el momento del diagnóstico. La retinopatía diabética tiene por lo general un curso progresivo. <sup>(20)</sup>

#### **Nefropatía diabética**

La nefropatía diabética constituye una patología con elevada morbimortalidad y es la principal causa de ingreso a tratamiento de diálisis;

constituye una de las complicaciones típicas de la macroangiopatía diabética, en cuya patogenia influyen diversos factores , siendo los dos más importantes, la hiperglucemia y la hipertensión arterial, que combinados va a producir importantes consecuencias clínicas. <sup>(22)</sup>

Esta complicación se desarrolla en el 30 al 50% de los pacientes con DM1, mientras tanto, la incidencia de nefropatía en DM2 oscila entre el 5-10 %.

### **Neuropatía diabética**

Se define como la presencia de signos y síntomas por disfunción de nervios periféricos en pacientes diabéticos; de las neuropatía asociadas a esta enfermedad, la más común es la sensorio-motora simétrica distal, la cual se manifiesta con dolor, alteraciones de la sensibilidad (guante o calcetín), alteraciones motoras y de los reflejos tendinosos y síntomas autonómicos; cabe señalar que es la principal causa de amputaciones no traumáticas de las extremidades. <sup>(24)</sup>

### **Dislipidemias**

Las dislipidemias constituyen una alteración común en la DM tipo 2, la más común es la llamada "dislipidemia aterogénica", elevación de los niveles de triglicéridos séricos, reducción del HDL-c y predominio de las partículas de LDL pequeñas y densas. Pueden ser causadas por defectos genéticos (dislipidemias primarias), o ser consecuencia de patologías o de factores ambientales (dislipidemias secundarias). En muchas ocasiones, los defectos genéticos requieren de la presencia de factores secundarios para expresarse clínicamente (dislipidemias de etiología mixta). <sup>(26)</sup>

Existen varios factores involucrados en la etiopatogenia de las dislipidemias de la DM2, destacando aquellos relacionados con cambios directos de los efectos biológicos de la insulina en el metabolismo de las lipoproteínas, RI, otros derivados de la hiperglicemia, que a través de la glicosilación y peroxidación, de proteínas estructurales y de fase rápida, al cambiar la morfología y funcionalidad de ellas y de sus receptores y finalmente otras derivadas de la aparición de complicaciones específicas, como la nefropatía. <sup>(27)</sup>

En la DM2 pacientes con obesidad, aproximadamente un 80% presentan RI, y éste parece ser el mecanismo clave de la dislipidemia en estos pacientes. La secuencia se inicia por la incapacidad de la insulina en condiciones de RI de suprimir la actividad de la lipasa del tejido adiposo, lo que se asocia a una mayor lipólisis, y liberación de ácidos grasos y glicerol. <sup>(28)</sup>

### **Pie diabético**

El pie diabético engloba un conjunto de síndromes en los que la presencia de neuropatía, isquemia e infección producen lesiones tisulares o úlceras debido a pequeños traumatismos, produciendo una importante morbilidad que puede llegar incluso a amputaciones. La mayoría de las personas con pie diabético presentan enfermedad arterial periférica. La isquemia y la infección pueden estar presentes también. <sup>(29)</sup>.

## **Obesidad como riesgo de DM2.**

La obesidad es el factor de riesgo de mayor relevancia en el desarrollo de DM2. Diversos estudios epidemiológicos demuestran que aproximadamente un 80% de los diabéticos de tipo 2 son obesos en el momento del diagnóstico. La incidencia de DM en los individuos obesos es de 3 a 4 veces mayor que en los individuos delgados. En personas obesas existe un riesgo progresivo de desarrollar diabetes a medida que aumenta el Índice de Masa Corporal (IMC). Las personas con un IMC > 27,9 tienen un riesgo siete veces superior de llegar a ser diabéticos en algún momento. El incremento de peso en edad adulta se relaciona con un mayor riesgo de desarrollar DM 2. La disminución de peso, aunque sea moderada, se asocia a una mejoría de la esperanza de vida en los pacientes con DM 2. <sup>(30)</sup>

Del mismo modo la asociación entre obesidad y diabetes de tipo 2 podría estar vinculada causalmente a través de la inflamación sistémica. Este modelo sugiere que el consumo excesivo de alimentos y bebidas con un alto contenido en grasas y azúcares provoca el crecimiento de los adipocitos, que son las células que forman el tejido adiposo, especializado en almacenar la energía en forma de grasas. Al aumentar el tamaño de los adipocitos, desarrollan hipoxia localizada (falta de oxígeno) y liberan mediadores inflamatorios, como oxígeno reactivo e intermediarios reactivos de nitrógeno, que aumentan la insensibilidad a la insulina. Esto, por último, genera un aumento de los ácidos grasos libres y la glucemia. La inflamación inducida por la obesidad está vinculada a la diabetes de tipo 2 al aumentar la insensibilidad a la insulina y la disfunción de las células  $\beta$ . <sup>(31)</sup>

## **Resistencia a la Insulina asociada a la obesidad y DM2**

La insulina es el principal regulador de la homeostasis de la glucosa y los lípidos. La insulina disminuye las concentraciones de glucosa, la gluconeogénesis y la lisis de glucógeno en el hígado, así como favorece el ingreso de la glucosa al músculo estriado y al tejido adiposo. Por otro lado, la insulina favorece la síntesis de triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo,

incrementando la circulación de las lipoproteínas por estimular la actividad de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo e inhibiendo la lipólisis del tejido adiposo y músculo. La obesidad juega un papel importante en el síndrome de RI, que incluye hiperinsulinemia, hipertensión, dislipidemia, DM2 y, por sobre todas las cosas, un riesgo incrementado a enfermedades cardiovasculares, incluso en niños. <sup>(32)</sup>

Se ha considerado que la obesidad es un estado proinflamatorio, por cuanto genera una cantidad importante de radicales libres que van a desencadenar un incremento en el estrés oxidativo, lo que trae aparejado una interrupción de las señales de traducción de la insulina, con la consiguiente RI. La asociación de obesidad con el síndrome de RI y por ende al riesgo de enfermedad cardiovascular no solo está relacionada al grado de obesidad, sino depende fundamentalmente a la distribución de la grasa. <sup>(33)</sup>

### **Respuesta inmune y Diabetes**

La palabra inmunidad proviene del latín *immunitas (inmunidad o protección)* cuya principal función es el de proveer protección a los seres vivos, de acuerdo a su desarrollo evolutivo. <sup>(34)</sup>

La respuesta inmune juega un papel muy importante durante el proceso fisiopatológico del desarrollo DM2, se ha descrito que el incremento en la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas, desencadenan mecanismos en los que está íntimamente relacionada la inflamación, que es considerada como una función homeostática de protección y de defensa, caracterizada por rubor, dolor, edema y falta de función en la zona afectada, si el proceso inmunológico reparador del daño es ineficiente, existe el riesgo del incremento de radicales libres y por lo tanto la inducción especies reactivas de oxígeno (EROS). <sup>(35)</sup>

En la inflamación participan tanto elementos celulares como humorales, próximos a la lesión, en el que la inmunidad celular esta mediada por los linfocitos T y sus productos como las citocinas <sup>(36)</sup>

## Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular esenciales para comunicación intercelular, son producidas por varios tipos celulares, principalmente por el Sistema Inmune (SI). Estos mediadores solubles controlan muchas funciones fisiológicas críticas tales como: diferenciación y maduración celular, inflamación y respuesta inmune local y sistémica, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y muchos otros procesos biológicos.<sup>(40)</sup>

Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización celular que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que resultan en la producción de otras citocinas, o un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas, o la supresión de su propio efecto mediante retroregulación.<sup>(40)</sup>

Las citocinas se pueden agrupar en 4 grupos funcionales de acuerdo al sitio o fase específica de la respuesta inmune en la que actúan, así:

1. Citocinas proinflamatorias, actúan en la respuesta inmune innata, inespecífica o inflamación.
2. Citocinas que favorecen el desarrollo de inmunidad celular y/o citotóxica.
3. Citocinas que favorecen la producción de las diversas clases de inmunoglobulinas o Inmunidad Humoral y
4. Citocinas con funciones extra-inmunológicas y/o homeostáticas.<sup>(40)</sup>

La DM es un proceso inflamatorio crónico que a su vez propicia la lesión tisular con su respectiva acción de mediadores proinflamatorios, como son las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ .

## IL-6

La IL-6 es secretada por varios tipos celulares, entre los cuales se encuentran las células del sistema inmune, fibroblastos, células endoteliales, músculo esquelético y tejido adiposo. Esta proteína se secreta en forma glucosilada cuyo peso molecular es de 22 a 27 kDa y se une a su receptor transmembranal. Esta puede ser secretada por distintas células, como macrófagos, células T, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, y neuronas. Las principales fuentes en el organismo humano son las células T y B, fibroblastos, y macrófagos. La síntesis de IL-6 por células secretoras es compleja y depende de la interrelación celular. De esta manera, las células T requieren de la estimulación previa por monocitos para su secreción, mientras que los monocitos son capaces de sintetizar IL-6 sin la necesidad de otras células. <sup>(41)</sup>

IL-6 tiene además de sus acciones inmunoregulatoras acciones de homeostasis de la glucosa y el metabolismo, directa e indirectamente por la acción sobre las células del músculo esquelético, los adipocitos, los hepatocitos, las células pancreáticas  $\beta$ -, y las células neuroendocrinas. <sup>(42)</sup>

Numerosos estudios sugieren un papel fisiopatológico en el desarrollo de DM2 altas concentraciones de IL-6 y la inducción de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva (pCr), conocidos como marcadores de inflamación sistémica, ambas actúan sinérgicamente para producir proteínas del complemento como mecanismo de respuesta inmune innata

## TNF- $\alpha$

Es una proteína que se expresa como un péptido de 26 kDa en la membrana celular y sufre un corte que da lugar a su forma soluble de 17 kDa.

Es una citocina proinflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos y células T. Su principal función es el reclutamiento y estimulación de neutrófilos y monocitos, junto con la inducción y regulación de mediadores de la inflamación, ya que desempeña un importante papel en la protección frente a la infección bacteriana. A nivel

sistémico se relaciona con estados febriles, shock, necrosis tumoral y apoptosis celular.<sup>(43)</sup>

Una vez que la DM2 está establecida como enfermedad crónica es difícil revertir el daño fisiopatológico, sin embargo en el intento de mantener un estado homeostático regulador de la glicemia, existen alternativas farmacológicas convencionales.

### **Tratamientos farmacológicos**

Los agentes orales están indicados en aquellos pacientes en que las recomendaciones iniciales para llevar a cabo un adecuado control glucémico con la dieta y el ejercicio fallan. Ha mostrado que la DM2 es un trastorno progresivo que puede ser tratado inicialmente con agentes orales en monoterapia, pero puede requerir el uso de otros fármacos orales en combinación. En otros pacientes la terapia con insulina puede ser necesaria<sup>(44)</sup>

La secreción de insulina disminuye progresivamente y casi todos los pacientes con DM2 con niveles de glucosa plasmática que exceden niveles de 180 a 200 mg/dl, tienen una respuesta a la insulina plasmática que es deficiente en términos absolutos; de aquí que los medicamentos que mejoran la secreción de insulina puedan ser efectivos para el tratamiento de estos pacientes.<sup>(45)</sup>

Las sulfonilureas son los fármacos de primera línea cuando no se logran las metas del tratamiento con el manejo no farmacológico. Estimulan la secreción de insulina, mediante la estimulación de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, a través de la inhibición de la bomba adenosintrifosfatasa (ATPasa). Aunque este es su principal efecto y reconocido durante muchos años, recientemente se le atribuye un efecto sobre la inhibición en la formación de glucosa a nivel hepático al reducir en promedio alrededor de 1.5% de Hemoglobina glicosilada (HbA1c). Presenta efectos secundarios, principalmente hipoglucemia, aunque no son tan frecuentes y suelen ser no graves. Se considera común un incremento de peso de alrededor de 2 kg, sobre todo al inicio del tratamiento.<sup>(46)</sup>

Las Biguanidas como la Metformina es un fármaco de gran efectividad para disminuir los niveles de glucosa plasmática; también reduce los niveles de triglicéridos y colesterol; la metformina trabaja reduciendo la producción basal de glucosa hepática y reforzando la sensibilidad a la insulina en el músculo. Es el único agente oral antidiabético que cuando es usado en monoterapia ha mostrado una reducción en las complicaciones macrovasculares de la enfermedad. La mayoría de los pacientes manejados con metformina pierden peso. Se recomienda iniciar el uso de metformina a dosis de 500 a 850 mg al día, ajustando la dosis de acuerdo con la respuesta, sin exceder los 3 gr al día. (47)

### **Modelos experimentales en el estudio de DM2**

Se utilizan tanto para el estudio de la etiología de la DM2 como parte del estudio de los mecanismos involucrados en las complicaciones, ya que las características generales de la diabetes en los animales son similares a los de la diabetes humana. Estos modelos permiten simular algunos fenómenos que se observan en la clínica y contribuyen al conocimiento de los factores fisiológicos, bioquímicos y ambientales que predisponen a la enfermedad.

La inducción química ha demostrado en los animales de experimentación que en la administración de diferentes sustancias provoca situaciones experimentales similares a la diabetes. Entre estos agentes químicos, el Aloxano es uno de los más efectivos y comúnmente utilizados: destruyendo las células  $\beta$ -pancreáticas por lo que pueden llegar a provocar ambos tipos de DM, administradas ya sea intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

Algunos de estos animales (Tabla 1) pueden llegar a producir un alto nivel de glucemia. Diversos factores genéticos y ambientales, edad, alimentación, cautiverio, influyen en la forma de manifestación de este síndrome, el cual ha sido estudiado en distintos modelos como se muestra en la (tabla 1). (48)

Especie	Lineas
Ratón	db/db (mutante) C57BL KsJ Spiny ( <i>Acomys cirinus</i> )
Rata	Sand. ( <i>Psamomys obesus</i> ) fa/fa OLEFT ( <i>Otsuka Long - Evans Tokushima Fatty</i> ) Obesa BBZ Wor
Mono	Riverus ( <i>Macaca mulatta</i> ) Celebes black ( <i>Macaca nigra</i> )
Hamster	H. chino ( <i>Cricetus griseus</i> ) H. húngaro ( <i>Phodopus sungorus</i> ) H sudamericano ( <i>Muscomys albicaudatus</i> )
Conejo	Nueva Zelandia
Curul	Hartley

TABLA 1 Especies de modelos experimentales que llegan a desarrollar DM2

Fuente: Clifford J, Flatt R. Animals síndromes of non insulindependent diabetes mellitus. En: Pickup C, Winzians G, eds. Textbook of diabetes mellitus. 2nd ed. New York: Blackwell Science; 1988:23.1-23.25.

## Terapias alternativas naturales

Por medicina alternativa se considera al conjunto de disciplinas terapéuticas y diagnósticas que existen fuera de las instituciones del sistema de salud convencional. El uso actual de esta 'clase' de medicina está muy extendido, tanto en el mundo industrial como el preindustrial. Parte del creciente uso de las terapias alternativas se debe a su reciente validación profesional. <sup>(49)</sup>

La OMS hace más de 20 años recomendó mayor investigación sobre el uso de plantas medicinales como tratamiento de la diabetes mellitus; el interés se ha centrado en la búsqueda de principios activos hipoglucemiantes y(o) antihiperoglucemiantes. Desde el punto de vista farmacológico, plantas potencialmente útiles actuarían a través de múltiples sitios diana y mecanismos de acción, lo que, por la patogenia multifactorial de la enfermedad, representa una ventaja sobre hipoglucemiantes conocidos; la combinación de principios activos de una misma planta o diferentes, con efectos farmacológicos sinérgicos, agonistas o antagonistas, pueden incrementar su eficacia y minimizar efectos adversos. <sup>(50)</sup>

Se han reportado un sinnúmero de especies vegetales con efectos hipoglucemiantes; sin embargo, la mayoría se utilizan de manera anecdótica o tradicional. Se presentan algunas especies en la tabla (2) reportada en la revista Fitoterapia.

PLANTA:NOMBRE COMÚN/ CIENTÍFICO	FUNCIÓN HIPOGLUCEMIANTE	DOSIS
<p>Goma guar (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.)</p>	<p>Se obtiene por molienda de los endospermos de las semillas. Su función hipoglucemiante se debe principalmente a la viscosidad que alcanza el mucílago en contacto con el agua, capaz de disminuir la velocidad de absorción de los hidratos de carbono y de retrasar el vaciado gástrico, lo que conlleva una mejor utilización de la insulina endógena, disminuyendo la hiperglucemia; asimismo, también contribuye a disminuir la colesterolemia, principalmente el cLDL.</p>	<p>Se recomienda administrar una dosis inicial de 4,5 g/día de goma guar en el desayuno, dosis que puede incrementarse a intervalos semanales hasta 4,5 g/8 h en las comidas principales. Se considera que el consumo diario de hasta 20 g/día de goma guar parcialmente hidrolizada es seguro.</p>
<p>Momórdica (<i>Momordica charantia</i> L.)</p>	<p>La momórdica o melón amargo es una de las especies vegetales con un mayor potencial como hipoglucemiante. Se emplean sus frutos, aunque también se utilizan las semillas, hojas y toda la planta.</p> <p>La actividad hipoglucemiante se ha puesto de manifiesto con</p>	<p>El fármaco es bastante seguro, no se han observado síntomas de toxicidad cuando se ingiere con alimentos, ni tampoco con la administración de diversos extractos</p>

	<p>todos los órganos de la planta, pero principalmente con los frutos. Parece deberse a las saponinas esteroídicas, a los péptidos (similares a la insulina) y a los alcaloides, pero se desconoce si la actividad se debe principalmente a uno de los grupos o al conjunto.</p>	<p>en los ensayos efectuados sobre su actividad. No se recomienda su administración a niños pequeños ni durante el embarazo, ya que tradicionalmente se ha considerado esta especie como abortiva.</p>
<p>Alholva (<i>Trigonella foenum-graecum</i> L.)</p>	<p>El fármaco son sus semillas, en cuya composición química destacan aminoácidos glucídicos, prótidos, lípidos, alcaloides flavonoides, esteroides. Entre los componentes causantes de la actividad hipoglucemiante parece tener un papel importante el aminoácido aislado, 4-hidroxi-isoleucina. Éste parece ejercer un efecto directo sobre islotes de Langerhans, incrementando la liberación de insulina inducida por glucosa.</p>	<p>La dosis recomendada como hipoglucemiante o en la hipercolesterolemia es de 25 g/día de semillas pulverizadas o preparados equivalentes. La alholva se puede administrar en forma de infusión, extracto fluido, tintura, etc. Por vía tópica puede añadirse al baño o emplearse en forma de linimento, unguento, etc.</p>

<p>Gimnema (<i>Gymnema sylvestre</i>)</p>	<p>Constituido por las hojas, en cuya composición química destacan las saponinas triterpénicas, resinas, compuestos nitrogenados (betaina, colina y trimetilamina), triterpenos y esteroides (estigmasterol).</p>	<p>Se ha demostrado que gimnema no sólo es capaz de reducir los valores de glucosa plasmática y de hemoglobina glucosilada, sino que también es capaz de incrementar las concentraciones séricas de insulina, lo que supone una posible acción reparadora en las células <math>\beta</math> pancreática. Se utiliza una dosis de 400 mg de extracto hidrosoluble de hojas</p>
---	---	---

Tabla 2 PRINCIPALES PLANTAS CON EFECTO HIPOGLUCEMIANTE DE ACUERDO A DOSIS. Fuente: Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante. (Revista Fitoterapia, Volumen 3, Número 2, noviembre de 2003)

Uno de los fitofármacos usados para el tratamiento de la DM2, es la ***Azadirachta indica*** o Neem que es la planta medicinal más tradicional y útil en la India. Cada parte del árbol de Neem tiene propiedades medicinales y por lo tanto susceptibles de explotación comercial. Se han encontrado compuestos químicos dentro de los compuestos de Neem y se han logrado avances con respecto a la actividad biológica y medicinal de ella. <sup>(51)</sup>

La planta medicinal *Azadirachta indica* es originaria de la India conocida como margosa, descrita en 1830 por De Jussieu, llamada también árbol de **Neem** en Inglés y paraíso en español, y su descripción taxonómica es: (52)

Orden: *Rutales*

Suborden: *Rutinae*

Familia: *Meliaceae*

Subfamilia: *Melioidae*

Género: *Azadirachta*

Especie: *índica*

*Azadirachta indica* conocido comúnmente como margosa y paraíso de la India en español y como Neem en inglés e hindi, es un árbol de tamaño mediano a grande, caracterizado por su fuste corto y recto, una corteza arrugada de color de marrón oscuro a gris y una copa densa y redondeada con hojas pinadas. Nativa al sur de Asia, la margosa se planta y naturaliza extensamente en las áreas semiáridas a través de Asia y África. (53)

Los múltiples usos del Neem le han dado apodos como "árbol de milagros" o "farmacia del pueblo". Se utiliza para tratar enfermedades de la piel, contra dolores, fiebres e infecciones. La madera sirve de combustible, en la construcción y en la fabricación de muebles. La flor atrae a las abejas que producen una miel de sabor agradable. Las propiedades de este árbol han sido aplicadas en la agricultura, como repelente de insectos, en medicina, veterinaria y cosmética. (54).

Por ser un árbol que crece con facilidad, necesita poca atención, da sombra, purifica el aire, tiene un sistema radical profundo, puede servir de abono, medicina, insecticida, proporciona madera y también da sombra, una de las características notables que presenta el árbol de *Azadirachta indica* es que está virtualmente libre de insectos y nemátodos. (55)

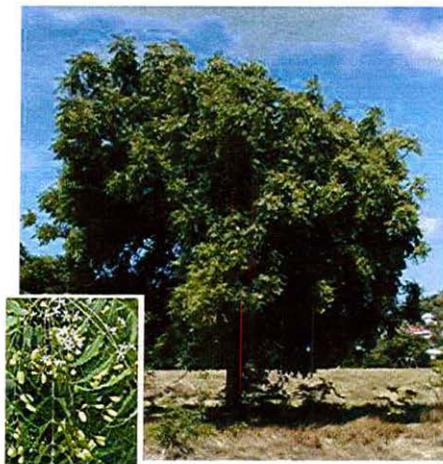


Imagen 1. Árbol de Neem (Fuente: neem4life.com)

Como insecticida natural se han encontrado distintos compuestos; las hojas y los frutos contienen una mezcla de ingredientes activos y como principal sustancia se considera la azadirachtina, encontrando su mayor concentración en las semillas. <sup>(56)</sup>

Tiene también actividad fungicida y fungistática de Neem. En este caso, no es el azadirachtin que es responsable de esta acción. Se sabe que el aceite de Neem, del cual se ha sacado el azadirachtin, resulta ser un potente fungicida. La corteza y las hojas pulverizadas tienen muchos usos, incluso como desinfectantes. Si se aplica el polvo sobre animales domésticos, se controlan eficazmente pulgas, garrapatas y otros ectoparásitos. Para el control de ciertos tipos de dermatitis e infecciones de la piel se vienen aplicando extractos acuosos de Neem. Las aplicaciones tópicas se usan también para eliminar toda clase de ectoparásitos humanos. Tomado por vía oral, el extracto de Neem parece tener propiedades antibióticas. <sup>(57)</sup>

Algunas de las propiedades biológicas del Neem se puede apreciar en la tabla (3):

Estructura Utilizada De Arbol De Neem	Actividad Biológica	Autor
Extracto acuoso de la planta	Efecto de extracto acuoso de Neem como Protector de úlceras gástricas	Dorababu M, Department of Pharmacology, 2006
Extracto en hoja y aceite esencial de semilla	Comparación entre glibenclamida y Neem como control en el efecto hipoglucémico en conejos diabéticos.	Khosla P, Indian J Physiol Pharmacol. 2000 Jan; 44(1):69-74.
Extracto de semilla	Efecto protector de extracto de semillas de Neem en estrés oxidativo causado por inducción de Estreptoizotocina (EzT) en ratas.	Gupta S, Division of Pharmacology and Toxicology, Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar 243 122, UP, India. International Journal of Pharmaceutic Review and Research.2010
Extracto de hoja deshidratada de hoja de Neem	Control en la disminución de niveles de glucosa utilizando extracto de hoja deshidratada DE Azadirachta Indica y Abroma augusta.	Halim EM. National Chemical Laboratory, Pune 411008, India
Extracto de aceites de semilla, extracto acuoso de hoja, infusión de hoja deshidratada, corteza de árbol de Neem.	Antiartrítico, Antipirético, Antihiperglucemiantes, Espermicida, tratamiento en úlceras gástricas, Antifúngico, Antibacterial, Diurético, Antitumoral, Inmunomodulador, Antiinflamatorio.	Kausik Biswas. Department of Physiology, Indian Institute of Chemical Biology, 4, Raja S.C. Mullick Road, Kolkata. India. 2007
Extracto alcohólico de hoja de Neem	Utilización del extracto alcohólico de Azadirachta indica como bactericida de importancia médica contra <i>E.coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermis</i> .	Vázquez, H. Minerva Revista en línea CIC-UES Diciembre 2007 Vol. 1
Extracto de hojas	Efectos antihiperglucemiantes y	Shradha Bisht.

de Neem	Antidislipidemicos de extracto de planta de <i>Azadirachta indica</i> en efectos de diabetes inducida por STZ.	B.N.College of Pharmacy, Udaipur, Rajasthan American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2008
Emulsión de semilla	Actividad de aceite de Neem como actividad larvicida y repelente de moscos.	Virendra K Dua. <i>Malaria Journal</i> 2009, 8:124

Tabla 3.Estructuras del árbol de Neem, sus diversos tratamientos clínicos y médicos.

## Planteamiento del problema

La diabetes mellitus (DM) es un grave problema de salud con alta prevalencia e incidencia y forma parte de las primeras causas de mortalidad en todo el mundo. La DM2 está asociada con varias complicaciones de salud como retinopatía, neuropatía diabética, enfermedades renales, úlceras e inmunosupresión transitoria. La farmacopea utilizada para el manejo de diabetes a largo plazo suele tener efectos tóxicos que por sus consecuencia van en deterioro de la salud del paciente.

Actualmente se ha incrementado el uso de productos naturales, como alternativa farmacológica en el manejo a la DM2, en la mayoría de ellos se observa el efecto hipoglucémico, tal es el caso del uso de la infusión de *Azadirachta indica* del árbol de **Neem**, este producto natural es ampliamente utilizado en la India. Sin embargo se desconoce el efecto en la respuesta inmune celular y en la expresión de las citocinas IL-6 y TNF-alfa de la infusión de *Azadirachta indica* en el modelo experimental de DM2.

## **Hipótesis**

La infusión por vía oral de *Azadirachta indica* en ratas diabéticas tipo 2 mejora la respuesta inmune celular y reduce la concentración de las de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ .

## **Objetivo general**

Evaluar la respuesta inmune celular y la expresión de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en ratas diabéticas tipo 2 expuestas a *Azadirachta indica* como tratamiento hipoglucemiante.

## **Objetivos específicos**

- Establecer el modelo de DM2 en modelo murino inducidos por Alozano.
- Determinar la concentración de glucosas sanguíneas y peso corporal en grupos control y experimentales.
- Evaluar la Respuesta Inmune Celular en suero de células mononucleares de sangre periférica y células esplénicas, en grupos experimentales y control.
- Medir la concentración de las enzimas hepáticas AST y ALT
- Cuantificar los niveles de la citocina IL-6 y TNF- $\alpha$ . en grupos experimentales y control.

## **Metodología.**

### **Diseño de estudio:**

Longitudinal, experimental, observacional, analítico.

### **Materiales y Métodos**

Se utilizaron ratas machos Wistar adultas siguiendo los lineamientos de manejo de animales de laboratorio de acuerdo a la **Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)**, en la sección de manejo y sacrificio de animales. Para el caso de los métodos y procedimientos de reactivos químicos y materiales biológicos de acuerdo a la **NOM-087 ECOL-SSA1-2002**. El presente proyecto fue aprobado por los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad, con el número **CI/028/2010**

Se utilizaron 40 ratas machos de la cepa Wistar adultas, con un peso de 150 grs de peso.

El trabajo experimental esta dividió en 2 etapas de la siguiente manera:

#### **Primera Etapa.**

En esta primera etapa se estableció el modelo de DM2 por lo que se utilizaron 15 ratas. Divididas en 2 grupos con 5 ratas control y 10 para inducción de DM2

Las ratas Wistar macho se expusieron a una nutrición enriquecida de colesterol y glucosa al peso de 150 gr se indujo la destrucción de las células beta a través de la inoculación vía intraperitoneal de Aloxano (SIGMA™) a una concentración de 50 mg/kg de peso. Para comprobar que los animales desarrollaron DM2 se evaluó el nivel de glucosa en sangre mediante el método enzimático de glucosa oxidasa y peroxidasa (God-Pod), mediante el uso glucómetro marca (Accutech™).

## **Segunda etapa**

Una vez establecida la dosis de *Azadirachta indica* y el modelo experimental de DM2 se formaron 3 grupos de la siguiente manera.

### **Grupo 1**

Este grupo se conformó por 5 ratas sanas (*ad libitum*) consideradas como, dosis placebo de agua consideradas como grupo (control -)

### **Grupo 2**

Grupo de ratas diabéticas consideradas como grupo (control +)

### **Grupo 3**

Ratas diabéticas expuestas a la infusión oral de *Azadirachta indica* con la concentración estandarizada de acuerdo a la curva dosis respuesta previamente estandarizada.

## **Preparación de la infusión**

Para elaborar la infusión de las hojas de *Azadirachta indica* se colocaron 0.5 gms/rata en un recipiente con 5 ml agua caliente, se tapó y se dejó reposar durante 5 min, se dosifico una dosis diaria de 1 ml. Vía oral con la utilización de una cánula, estandarizada en tiempo.

A Todos los animales experimentales y controles de las diferentes etapas se cuantifico el nivel de glucosa en sangre mediante tiras reactivas y se calculará mediante una fórmula estándar de glucosa de 100 mg/d, a través de un glucómetro marca (Accutech™).

## **Cultivo celular**

Según Mossman para evaluar la respuesta inmune celular se realizaron ensayos de actividad proliferativa, en células esplénicas (bazo) y células mononucleares de sangre periférica (SP) en las ratas experimentales y control.

La respuesta inmune celular se realizo mediante cultivo celular, se tomo sangre periférica a través de punción intracardiaca con aguja heparinizada. Se procedió a obtener células mononucleares purificadas con la utilización de un gradiente de separación Lymphoprep (Nycomed™) con una densidad de 1.007, a temperatura ambiente (TA) se centrifugo a 1,500 RPM, durante 30 min

posteriormente se obtuvieron las células purificadas y se realizaron lavados con PBS a un pH de 7.2 y se centrifugaron a 1,500 RPM a 4°C 2 veces consecutivas.

Para la obtención de células esplénicas (bazo) una vez que se sacrificó a las ratas experimentales y controles bajo condiciones de esterilidad por calor se hizo la disección del bazo en medio de cultivo RPMI-1640, y se homogenizó el tejido en caja de petri, esta mezcla se depositó en un tubo con gradiente de Ficoll con una densidad de 1.006, se centrifugó a 1,500 RPM durante 30 min y se realizaron 2 lavados consecutivos con PBS con un pH de 7.2, una vez obtenida la población purificada (células mononucleares y células esplénicas respectivamente) se procedió a verificar la viabilidad con azul de tripano (Sigma™) e inmediatamente las células se cuantificaron en una cámara de Neuvauer (Reichert™), utilizando una solución de líquido de Turk (solución ácido acético al 3% con agua destilada).

En placa de cultivo se agregaron  $8 \times 10^5$  células (de manera independiente las células mononucleares y las células esplénicas) por pozo con y sin Fitoheماغlutinina (PHA) (Sigma™) a una concentración final de 10 µg/mL se incubó durante 72 horas, en estufa de cultivo en ambiente de humedad del 98% y con una concentración del 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente se adicionó MTT (Sigma™), (3,[4,5 Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), posteriormente se incubó 2 horas más a 37 °C en estufa de cultivo con una concentración de 5% de CO<sub>2</sub>, después se agregó buffer de extracción que contiene 20% de SDS (Sigma™) 50% de Dimetil-Formamida (Sigma™) y 50% de H<sub>2</sub>O estéril y se incubó de nuevo durante 18 horas más, una vez que concluyó la incubación se procedió a realizar la lectura en espectrofotómetro (Biotek HT-Sinergy™) lector de ELISA a una longitud de onda de 570nm.

De manera independiente se obtuvo SP de las ratas control y experimentales, se centrifugó la muestra a 3000 RPM durante 10 minutos a TA para obtener suero al cual una vez obtenido se agregó un inhibidor de proteasas (GE Healthcare™) para posteriormente evaluar la concentración de las citocinas IL-6 y TNFα soluble, mediante el uso de Kit's comerciales de ELISA (R&D™) que se cuantificó en un lector placas de ELISA (Biotek HT-

**Sinergy™**) a una longitud de onda de 405 nm con corrección de (400-630 nm), los resultados obtenidos se expresaran en concentración nmol/mL.

Además se evaluó la concentración de enzimas hepáticas Aspartato Amino Transferasa (AST) y Alanin Amino Transferas (ALT), para evaluar daño hepático, mediante ensayos colorimétrico enzimático (Merck™)

### **Análisis estadístico**

Para el análisis de las variables inmunológicas se empleó Análisis de Varianza y dependiendo del resultado y distribución se usó pruebas paramétricas (t de Student) o no paramétricas (U de Mann-Whitney). Se categorizó las diferentes variables cuantitativas y la distribución de estas en el grupo control (sin diabetes, con diabetes, con diabetes e infusión de *Azadirachta indica*). Se realizó correlación de Pearson entre las variables cuantitativas como la concentración de Glucosa, AST, ALT, y citocinas proinflamatorias y una correlación de Spearman entre el IL-6, TNF $\alpha$ , AST y ALT.

**Bioseguridad:** Los métodos y procedimientos que se aplicaron en este proyecto no impactaron el medio ambiente. Los reactivos químicos y los materiales biológicos fueron descartados según la **NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002** y, para procedimientos, manejo y desecho de productos biológico-infecciosos, químicos y radioisótopos **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005**. Se emplearon bolsas con el color establecido para desechos biológico infecciosos bolsa roja para el desecho de algodón y gasa con sangre y contenedores rígidos para (tubos con sangre inactivada previamente con cloro) para punzocortantes considerado como desecho por la **NOM-087** como (aguja de vacutainer que se utilizó en la toma de muestra) se desecharán en recipiente rígido de polipropileno etiquetado siguiendo la **NOM**. Los reactivos de desecho (producto del análisis de cultivo celular, y ELISAS) se desechó en bolsa roja de polipropileno debidamente etiquetadas de acuerdo a la norma cuya leyenda dice desechos sólidos no peligrosos para su posterior incineración. El centro Universitario de Ciencias de la Salud cuenta el servicio de una empresa contratada para el manejo y disposición de los residuos patológicos y químicos. No se empleó materiales radioactivos o productos que

dañen al ambiente o que expongan la salud de los investigadores, estudiantes y trabajadores del centro Universitario

## Resultados

Para la estandarización del modelo al azar 10 ratas fueron seleccionadas a las cuales se inoculo por una sola ocasión (200 mg/mL) de Aloxano vía intraperitoneal y debido al alto índice de mortalidad por la susceptibilidad al químico, logamos obtener unas (n=6) ratas diabéticas; las ratas seleccionadas como controles únicamente se inoculo vehículo por la misma vía.

Ambos grupos recibieron dieta enriquecida compuesta por (10% de colesterol, 10% de glucosa y un 70% de aceite de coco, todos estos componentes embebidos en alimento especial para roedores) para establecer las condiciones ideales de la DM2, las ratas fueron alimentadas de la misma manera durante 3 semanas consecutivas y se registro el peso así como la concentración de glucosa sérica en ambos grupos.

Para la toma de muestra ambos grupos se dejaban en ayuno durante 12 horas y se registraba la concentración de glucosa a través del método God-Pod tal como se describe en material y métodos.

En esta primera etapa observamos los siguientes resultados, no encontramos diferencias significativas en relación al peso en ambos grupos control *versus* grupo experimental ( $133.81 \pm 24.66$  vs  $163.62 \pm 17.33$ ) respectivamente (Figura 4).

En relación a la concentración sérica de glucosa el grupo control no presentó cambios significativos, sin embargo el grupo experimental de inducción con Aloxano se incrementó por arriba de 150 gr/dL a partir de la primer semana, ( $180.15 \pm 94.23$  vs  $65.45 \pm 0.887$ ) comparado con el grupo control durante tres semanas consecutivas encontrándose una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.000$ , se verificó el peso por semana y se

cuantificó la glucosa sérica respectivamente, datos se representa en la (Figura 5).

Este modelo fue realizado por duplicado para verificar el modelo de DM2, se sacrificaron las ratas previa toma de sangre periférica por punción cardiaca para cuantificar la concentración sérica de citocinas, gráficos representativos en la (Figura 6). Para el caso de IL-6 ( $6.8 \pm 2.0$  vs  $14.14$  vs  $3.68^*$ ), y para TNF-alfa ( $1.20 \pm 0.55$  vs  $3.72 \pm 0.72^{\psi}$ ), con una diferencia significativa  $p > 0.004$  para ambas citocinas.

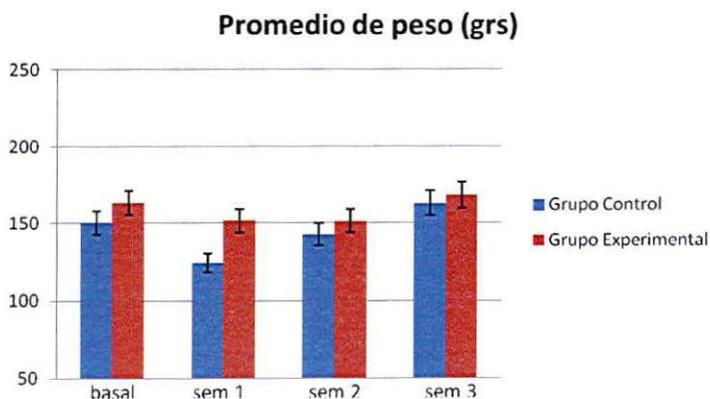


Figura 4 Peso de ratas machos wistar controles y diabeticas durante 3 semanas consecutivas para estandarizacion del modelo de DM2, los datos son expresados en promedios mas DS, no se observaron diferencias estadisticamente significativas.

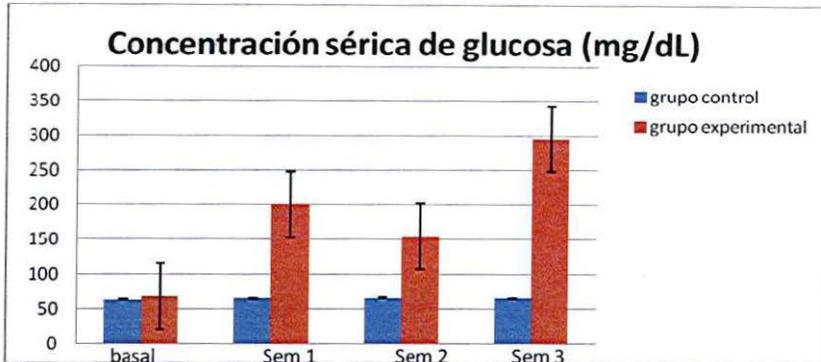


Figura 5 Valores obtenidos de glucosa sérica de las ratas machos wistar controles y diabéticas observado en un periodo de 3 semanas consecutivas para estandarización del modelo de DM2, los datos son expresados en promedios mas DS, se observaron diferencias estadísticamente significativas con una  $p > 0.004$  en el grupo de ratas experimentales vs control respectivamente.

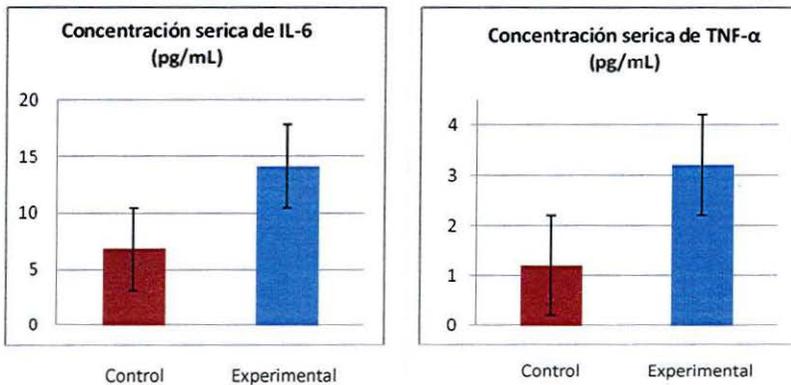


Figura 6 Se encontró una diferencia significativa en la concentración de IL-6 del grupo experimental vs control (representación en A), para el caso de B) TNF- $\alpha$ , se observó una menor concentración en el grupo experimental sin embargo también se observó diferencia significativa en el mismo grupo experimental con una  $p > 0.004$  para ambas citocinas.

Una vez verificado dicho modelo se realizó una selección al azar de 15 ratas para establecer la segunda etapa.

Los grupos seleccionados comprendidos de 5 ratas c/u y se clasificaron de la siguiente manera:

- Control negativo (dieta modificada sin diabetes)
- Control Positivo (dieta modificada + diabetes)
- Tratamiento (dieta modificada + diabetes + Neem)

Una vez clasificados los grupos se registró el peso y se etiquetaron debidamente las jaulas para iniciar con el registro de peso individual en los grupos, se indujo DM2 para el grupo control positivo y el experimental expuesto a Neem durante 6 semanas.

Los datos registrados del peso se observan en la (figura 7), cabe mencionar que para inducir la DM2 las ratas seleccionadas al azar de la misma camada deben alcanzar un peso de 150 grs, como se puede observar en la grafica, para el caso de los controles que solo recibieron la dieta modificada se observo incremento de peso, para el caso de ambos grupos de diabetes se observaron pequeñas variaciones con relación al peso, sin embargo el grupo de tratamiento con Neem mostro un discreto incremento de peso a partir de la segunda semana, sin embargo nunca se equiparo al promedio de ambos grupos tanto el control como las ratas diabéticas y se observo una ligera disminución del peso en el grupo de ratas con DM2 mas Neem.

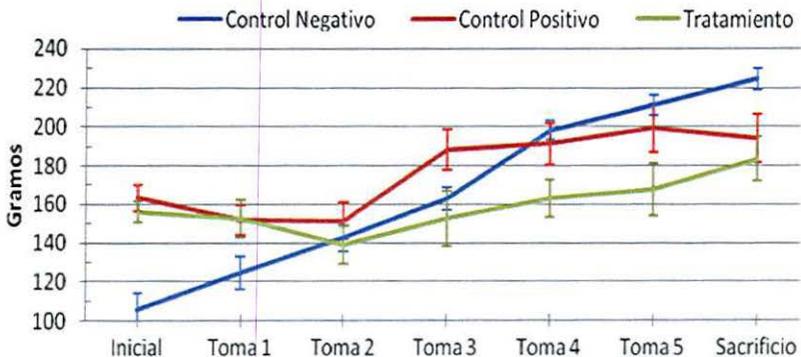


Figura 7. Peso corporal. Datos expresados en promedio  $\pm$  Desviación Estándar.

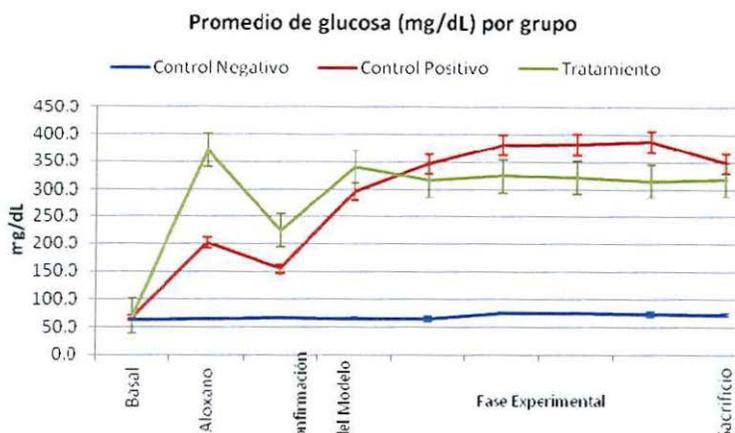


Figura 8. Cuantificación de glucosa en sangre periférica valores expresados en promedio con su respectiva DE se observó diferencia significativa del grupo control con los grupos experimentales de DM2 y DM2 + Neem respectivamente.

Se evaluó la concentración de glucosa en los tres grupos y se observó una diferencia altamente significativa del grupo control vs grupos experimentales de DM2, con una significancia menor de  $p > 0.05$  para el grupo de tratamiento de Neem y una  $p < 0.004$  en el grupo de DM2 sin tratamiento datos representados en la (figura 8) y el concentrado de los datos se representan en la (tabla 4)

Grupos	Toma de Glucosa (mg/dL)								Sacrificio	
	Basal	Aloxano	1	2	3	4	5	6		
Control	64.0	65.6	66.4	65.8	65.0	75.0	75.6	73.8	72.6	NS
DM2	69.0	201.6*	155.0	295.8	346.0	380.4	382.0	387.2	348.0	$p > 0.004$
DM2+Neem	70.4	370.6 <sup>ψ</sup>	224.2	340.8	315.4	324.0	322.0	315.0	318.0	$p > 0.001$

Tabla 4. Concentración de glucosa en sangre periférica de los grupos estudiados, los resultados son expresados en promedio  $\pm$  DE, la significancia descrita es en ambos grupos de diabetes basal vs semanas de tratamiento.

Se evaluó la respuesta inmune celular al finalizar las 8 semanas de tratamiento, se anestesiaron las ratas para realizar una punción intracardiaca y se obtuvo la sangre periférica, para obtener células mononucleares, tal como

se describe en material y métodos y se evaluó la respuesta inmune, una vez obtenida la muestra sanguínea se procedió a realizar disección de los órganos y se obtuvo el bazo para de igual manera evaluar la respuesta inmune en células esplénicas.

Se observó una disminución en el Índice de Proliferación (IP) de las células mononucleares del grupo de ratas con DM2, y con DM2+Neem, con respecto al control, sin embargo el grupo de ratas diabéticas y que recibieron por vía oral Neem se observó un discreto incremento ( $1.816 \pm 0.10$  vs  $1.278 \pm 0.30$  vs  $1.532 \pm 0.11$ ) datos representados en la (figura 9) letra A, en tanto que las fotografías B, C, D, son representativas del comportamiento de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en los tres grupos estudiados.

Resultados similares fueron encontrados en el cultivo de células esplénicas en los tres grupos estudiados ( $1.844 \pm 0.19$  vs  $1.414 \pm 0.17$  vs  $1.478 \pm 0.071$ ) representación en la (figura 10) A, y en las fotografías B, C, D, se observó el comportamiento proliferativo de las células esplénicas de 3 grupos respectivos.

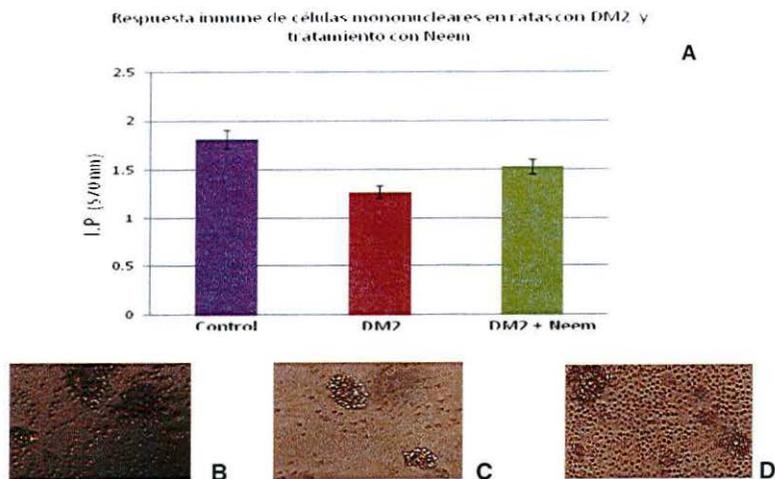


FIGURA 9 Respuesta inmune a través del (IP) en los grupos de estudio en la A) los resultados están representados en Promedio  $\pm$  DS.

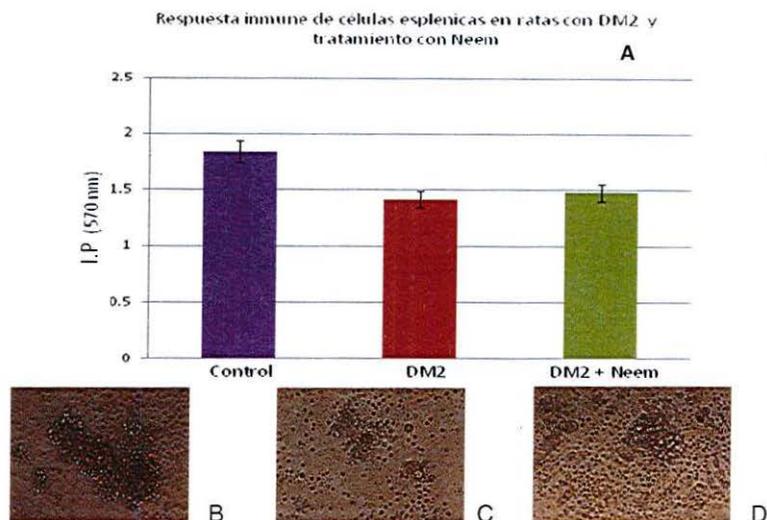


FIGURA 10 Respuesta inmune a través del (IP) en los grupos de estudio en la A) los resultados están representados en Promedio  $\pm$  DS.

Con relación a la concentración de citocinas, se observó un incremento en ambos grupos con relación al control de IL-6 ( $6.8 \pm 2.0$  vs  $14.14$  vs  $13.68^*$ ), en el que se observó una diferencia estadísticamente significativa con una  $p > 0.002$ , sin embargo solo se observó un ligero decremento en el grupo con DM2+Neem, los datos se encuentran representados en la (figura 11).

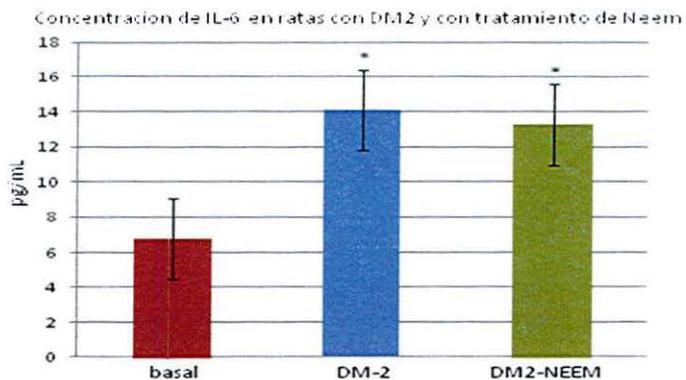


Figura 11 Concentración de IL-6 en sangre periférica de los grupos estudiados, los datos se encuentran expresados en promedio  $\pm$  DE, se observo una significancias con una  $p > 0.002$  del grupo control vs DM2\* y DM2+NEEM\*

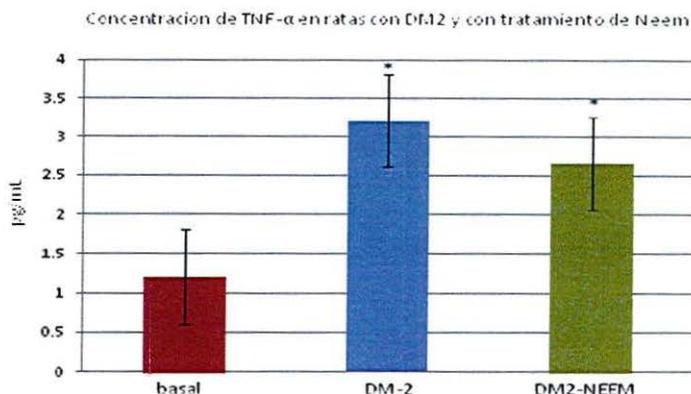


Figura 12) Concentración de IL- 6 en suero de los grupos estudiados, los datos se encuentran expresados en promedio  $\pm$  DE, se observo una significancias con una  $p > 0.002$  del grupo control vs DM2\* y DM2+NEEM\*

Un comportamiento similar se observó en la concentración de la citocina TNF- $\alpha$ , el incremento fue mayor en los grupos experimentales comparados con el grupo control sin embargo un discreto decremento se observa en el grupo que recibió el tratamiento de Neem ( $1.2 \pm 0.55$ ,  $3.2 \pm 1.72$ ,  $2.66 \pm 0.59$ ) respectivamente datos expresados en la (figura 12)

Con el objetivo de observar daño hepático se evaluaron las enzimas hepáticas enzima AST y ALT, y se observó que las ratas diabéticas suplementadas con el fitofármaco no se incrementaron de manera considerable comparada con el grupo de diabéticas sin tratamiento los resultados se presentan en la (tabla 5).

Grupos	AST	ALT
Control	58.49 $\pm$ 7.17	81.24 $\pm$ 12.30
DM2	139.24 $\pm$ 28.64	299.64 $\pm$ 35.50
DM2 + NEEM	87.57 $\pm$ 9.44	192.86 $\pm$ 16.92

Tabla 5. Concentración de enzimas hepáticas AST, ALT en suero de los grupos estudiados, los resultados son expresados en promedio  $\pm$  DE, la significancia descrita es en ambos grupos de diabetes

## Discusión

La DM2, es una de las enfermedades crónico-degenerativas con mayor índice de mortalidad a nivel mundial incluyendo México. <sup>(2)</sup>

Factores de riesgo asociados al desarrollo de la DM2 es el estilo de vida y la obesidad, este último representa el 70% de la población adulta en México y en Jalisco, lo que explicaría en gran medida la exponencialidad en la aparición de DM. <sup>(12)</sup>

La DM2 es un mecanismo fisiológico complejo debido al desbalance entre el incremento de glucosa y la baja producción de la insulina que genera un mecanismo denominado resistencia a la insulina, como producto de la destrucción de células  $\beta$ . <sup>(12)</sup>

El tratamiento del paciente diabético no solo depende del hecho de administrarle un medicamento para su control; sino de ayudar de manera alternativa a reducir los niveles de glucosa, sin embargo los fármacos hipoglucemiantes como: glibenclamida, metformina, la combinación de ambos y la insulina, su uso prolongado puede causar algún efecto tóxico en los pacientes con DM2 y por lo tanto va en detrimento de la salud. <sup>(47)</sup>

Desde hace muchos años se tiene un gran reconocimiento a la medicina tradicional (denominada terapia alternativa), en la cual se utiliza a la naturaleza para este fin, encontrando en las plantas una alternativa sencilla, económica y de fácil acceso. <sup>(14)</sup>

Los múltiples usos de la *Azadirachta indica* le han dado sobrenombres como "árbol de milagros" o "farmacia del pueblo". Se utiliza para tratar enfermedades de la piel, contra dolores, fiebres e infecciones. Los primeros escritos que nos indicaban que el *Azadirachta* se usaba como medicamento datan de más de 4.500 años de antigüedad aproximadamente. <sup>(23)</sup>

Las hojas de *Azadirachta indica* son utilizadas, de manera empírica, es conocida ampliamente como insecticida contra más de 200 especies de plagas. Estudios fotoquímicos han demostrado la presencia de resinas, alcaloides y sustancias tanínicas se degrada lábilmente a la luz, pH alcalino y calor. Posee un amplio espectro de actividades biológicas, entre estas propiedades incluyen efectos antiinflamatorio, antiviral. <sup>(16,17, 18, 19, 20)</sup> Sin embargo también tiene la

propiedad de ser un excelente fertilizante, afectan entre cuatrocientas y quinientas especies de plagas pertenecientes a *Blattodea*, *Caelifera*, *Coleoptera*, *Dermáptera*, *Díptera*, *Ensífera*, *Hetroptera*, *Homóptera*, *Himenóptera*, *Isóptera*, *Lepidóptera*, *Phasmida*, *Phthiraptera*, *Siphonoptera* y *Thysanoptera*, ostrácodos, arañas y nematodos, especies nocivas de lombrices y hongos. <sup>(22)</sup>

En un esfuerzo por dejar de lado el empirismo y volver científico el uso de la *Azadirachta indica* en el tratamiento de la DM2, se ha utilizado en diversos estudios de fase preclínica, especialmente en el modelo murino.

Dada la diversificación de usos de este vegetal y en base a estos antecedentes nosotros enfocamos nuestra atención a investigar si bajo condiciones normales pudiera tener algún efecto citotóxico directo al consumo de las hojas de *Neem*.

Realizamos una curva dosis respuesta en ratas sanas a las que se les monitoreo durante tres meses de exposición por vía oral diferentes dosis del extracto de Neem (1.75 mg=baja, 3.5 mg= media, 7mg=alta y como control ratas ad libitum), se evaluó la citotoxicidad en hígado, riñón, intestino y páncreas, no presentó alteraciones histopatológicas a las diferentes dosis, excepto en bazo se observó pequeño infiltrado celular a dosis altas. De igual manera observamos disminución en el peso y en la concentración de glucosa sérica de las ratas que recibieron la infusión comparadas con el control, no se observaron alteraciones en las enzimas hepáticas, este estudio lo realizamos en dos ocasiones de manera independiente. <sup>(58)</sup>

Una vez establecida la dosis de Neem iniciamos nuestra primera fase del estudio que consistió en la inducción del modelo de DM2, como se describe en material y métodos y debido a que la DM2 está relacionada directamente con el medio ambiente y la obesidad, establecimos una dieta hipocalórica que indujera cambios dinámicos en el metabolismo de nuestras ratas al momento de las inducción con Aloxano <sup>(58)</sup>. Se observó un incremento en la glucosa durante las tres semanas de evaluación del modelo. Nuestros resultados son similares a los publicados por Bisht y Ebong.

Una vez establecido el modelo de DM2 y la dosis ideal de *Azadirachta indica* se procedió a la segunda fase del estudio.

Las ratas diabéticas expuestas a la *Azadirachta indica*, presentaron una disminución tanto en el peso como en los niveles de glucosa, a las 6 semanas de tratamiento comparada con las ratas diabéticas, si bien no observamos diferencia estadísticamente significativa, la tendencia es muy evidente de disminución de la glicemia. A pesar que nuestros resultados no fueron semejantes a los publicados por Bath y Bisht, probablemente este asociado directamente a que son modelos inducidos por Estreptozotocina y en particular en el modelo de Bisht utilizaron ratones Swwis. Sin embargo Ebong quien utilizó el modelo de Aloxano presenta resultados similares a los que nosotros encontramos en nuestro grupo de estudio.

Este último autor menciona que las ratas expuestas a *Azadirachta indica* presentaron una ligera disminución de peso, sin que fuera significativo, datos semejantes encontramos en nuestro grupo de ratas expuestas al mismo fitofármaco. <sup>(58)</sup>

Se ha reportado que la infusión de *Azadirachta indica* con propiedades antiinflamatorias, está asociada directamente a los compuestos metabólicos propios de Neem, Biswas y col mencionan que existen alrededor de 130 metabolitos derivados de extractos de Neem, y que algunos de estos compuestos pueden tener propiedades antiinflamatorias.

Debido a que la DM2, es una enfermedad crónica degenerativa en la que la inflamación es constante, nuestro propósito fue observar no únicamente la capacidad hipoglucemiante, también evaluamos la respuesta inmune celular en el cual la respuesta inmune celular juega un papel importante en la actividad de respuesta de las células mononucleares.

Nuestros resultados nos permitieron observar una ligera recuperación de la respuesta inmune celular en las ratas diabéticas expuestas a *Azadirachta indica*, de igual manera medimos la concentración de enzimas hepáticas AST y ALT como indicadores de daño y observamos una reducción considerable de la mismas en este mismo grupo comparadas con el grupo de diabéticas. Estudios realizados por Shirish observó que la infusión por *Azadirachta indica* puede producir hepatoprotección en modelos de daño hepático.

Sin embargo durante el proceso fisiopatológico de DM2 se induce estrés oxidativo que desencadena el incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias, se ha reportado un incremento considerable de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-18 circulante de manera crónica, en personas con obesidad, resistencia a la insulina e inclusive en DM2. <sup>(9)</sup> En base a estos datos nosotros evaluamos la respuesta de las citocinas pro-inflamatorias en las ratas diabéticas expuestas y no expuestas a *Azadirachta indica* y observamos menor incremento de las citocinas IL-6 y TNF-alfa, en las ratas que recibieron Neem.

Estudio previo realizado en nuestro laboratorio evaluamos las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en ratas sanas expuestas a diferentes concentraciones de *Azadirachta indica* y no observamos cambios en la concentración comparado con el grupo control. <sup>(59)</sup>

Es importante mencionar que no hay reportes en la literatura que nos permitan comparar estos parámetros.

## **Conclusiones.**

1. Al inducir por vía oral del extracto de *Azadirachta indica* se vio un efecto en la reducción de peso no significativo en las ratas diabéticas en comparación con el grupo control.
2. Se observó disminución de la glucosa en sangre en el grupo de ratas diabéticas más *Azadirachta indica* sin una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos control y diabéticas sin tratamiento.
3. La respuesta inmune celular de esplenocitos y de células mononucleares no se vio afectada en las ratas diabéticas que recibieron la infusión de *Azadirachta indica*.
4. La concentración de AST y ALT no se incrementaron en el grupo de ratas diabéticas que recibieron *Azadirachta indica* en comparación con el grupo control.
5. Las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$ , presentaron un incremento en las ratas diabéticas, comparadas con el grupo control sin embargo fue menor en el grupo de ratas expuestas a la infusión de *Azadirachta indica*.
6. Al obtener los resultados del estudio del efecto hipoglucemiante de *Azadirachta indica* se pueden observar mejores resultados si el tratamiento se induce en mayor tiempo para que de este modo poder dar una mejor utilidad terapéutica al tratamiento en DM2 en ratas y posteriormente aplicarla en pacientes.

## **PERSPECTIVAS DEL PROYECTO**

1. Ampliación del tiempo de experimentación en el modelo para observar a largo plazo la efectividad farmacológica de *Azadirachta indica*.
2. Este modelo nos permite evaluar desde el punto de vista molecular la expresión del receptor GLUT-4 y el receptor de insulina por efecto del fitofármaco.
3. La probable utilización de esta fitoterapia en el tratamiento en humanos con DM2.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fajan SS. Classification and diagnosis. En: Ellenberg, Rilkin, ed. 4a. edición. Elsevier Science Publishing Co. Inc.,1990:346
2. Mann JI. The role of nutritional modifications in the prevention of macrovascular complications of diabetes. *Diabetes* 1997;46 (Suppl 2): S125-S130.
3. Organización Mundial de la Salud (2010). Día Mundial de la Diabetes. Documento revisado el 21 de octubre de 2011 de: <http://www.worlddiabetesday.org/es>.
4. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 21(Suppl 1): S5-S16
5. Jose Rodriguez Dominguez, Director General de Medicina Preventiva, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Servicios de Salud, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3o. fracción XV, 13 apartado A) fracción I y III 158, 159, 160 y 161 de la Ley General de Salud, los artículos 38 fracción II , 46 fracción XI, 41, 43 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y en el artículo 19 fracción II del Reglamento Interior de la Secretaria de Salud.
6. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT). Documento revisado 21 de octubre de 2011 <http://www.dof.gob.mx/documentos/3868/Salud/Salud.htm>. documento revisado 21 de octubre de 2011.
7. [www.jalisco.gob.mx/wps/portal/sriaSalud](http://www.jalisco.gob.mx/wps/portal/sriaSalud). documento revisado 22 de octubre de 2011.
8. ADA Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 29 (suppl 1): s43-s48; 2006.
9. Jubiz W. Factores de riesgo. En: *Endocrinología clínica*, México: El Manual Moderno, 1984:158-160.

10. SSA (2007). Programa Nacional de Salud 2007-2012, por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. México: SSA.
11. CONAPO (2010). *Indicadores demográficos básicos, 1990-2050*.  
[http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=125&Itemid=193](http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=125&Itemid=193) Documento revisado el 19 de octubre de 2011.
12. [www.jalisco.gob.mx/wps/portal/sriaSalud](http://www.jalisco.gob.mx/wps/portal/sriaSalud) documento revisado 20 de octubre de 2011.
13. Cuadernos de Salud. Hipertensión, diabetes y enfermedad cardiovascular Secretaría de Salud, México, D.F., 1994.
14. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 21(Suppl 1): S5-S16.
15. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 21(Suppl 1): S5-S16.
16. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997, 21(Suppl 1): S5-S16.
17. ADA Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 29 (suppl 1): s43-s48; 2006.
18. Alvaríñas JH, Salzberg S. Diabetes gestacional: diagnóstico, tratamiento y criterios de derivación. En: Gagliardino JJ, Fabiano A, Alvaríñas J, Sereday M, Sinayl. Ed. Diabetes tipo 2 no insulino dependiente: su diagnóstico, control y tratamiento. Buenos Aires: Sociedad argentina de diabetes: 1999:177-186.
19. Serrano Ríos M. Epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 2001; 121 (suppl): 4-7.
20. Andreoli CM, Millar JW. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy For Ocular Neovascular Disease. 2007 Nov; 18 (6): 502-8.
21. Argento C. Oftalmología General: Introducción Para El Especialista, 1ª Edición. Rosario: Editorial Corpus, 2007; 352-361.
22. Mogensen, CE. Prediction of clinical diabetic nephropathy in IDDM patients. Alternatives to microalbuminuria? *Diabetes* 1990;39:761.
23. Pérez Gracia R, Rodríguez Benítez P, Dall'Anesse C, Gómez Campderá F, Valderrabano F. Preocupante incremento de la diabetes como causa

- de insuficiencia renal terminal. Evaluación del tratamiento sustitutivo. *An Med Interna (Madrid)* 2001; 18: 175-180.
24. Gonzalez-Clemente JM, Palma S, et al. Is diabetic mellitus coronary heart disease equivalent? Results of a meta-analysis of prospective studies. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:1167-1670.
25. American Diabets Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2008. *Diabetes Care* 2008;31:12-24.
26. Arteaga A., Velasco N.: Dislipidemias. *Bol. Esc. Medicina. P. Univ. Católica* 1991 ; 20 :88 – 93
27. Ziegler O, Guerci B, Candiloros H, Drouin P. Lipoprotein (a) and diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 1995 Apr; 21 (2): 127-38
28. Steiner G. Dyslipoproteinemias of Diabetes. *Atherosclerosis.* 1994; 110 ( suppl.): S27-33
29. Martínez FR y cols. Pie diabético, epidemiología, implicaciones quirúrgicas y su costo. *Cir Gen* 1991;13: 289-290
30. Instituto Nacional de Estadísticas. Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos de los Hogares 2006-2007.
31. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:972-8.
32. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X) an expanding definition *Ann. Rev. Med.* 1993; 44:121.
33. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2000;106:453-8.
34. Abbas. AK, Lichman. AH. *Inmunología celular y molecular.* Quinta Edición, Elsevier Science, 2004. P 1-15 .
35. Roitt I, Brostoff J, Male D, *Inmunología,* segunda edición, Salvat, 1991; 1.1-2. 28.

36. Muñoz M, Mazure RA. Y Culebras JM. Obesidad y sistema inmune, nutrición hospitalaria 2004, 19(6) 319-324.
37. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología, Mc Graw Hill, Quinta edición, 2004; 1-24.
38. Roitt I, Brostoff J, Male D. Selection of the T cell repertoire. Immunology. 5 ta Ed. London: Mosby; 1998:67-94.
39. Roitt I, Brostoff J, Male D. Selection of the T cell repertoire. Immunology. 5 ta Ed. London: Mosby; 1998:67-94.
40. [http://inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com\\_content&view=article&id=79:citocinasyquimiocinas&catid=43:citocinasquimiocinas&Itemid=126](http://inmunologiaenlinea.es/index.php?option=com_content&view=article&id=79:citocinasyquimiocinas&catid=43:citocinasquimiocinas&Itemid=126). Documento revisado 25 de octubre de 2011
41. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(5):2084-2089.
42. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. Diabetes 2002;51(12):3391-3399.
43. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 1996;383:787-93.
44. Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM, Bennett PH. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. Lancet 1989;1:1356-9.
45. DeFronzo RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus (review) Ann Inter Med 1999;131(4):281-303.
46. David M, Nathan, MD1, John B, et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetes Care. 2006;29(8):1963-72.

47. González Ayala. Botánica Medicina Popular. Edit Cuscatlan: 1994 Vol 2: p. 91
48. Standards of medical care with patients with diabetes mellitus. American Diabetes Asociation. Diabetes Care 2004; 27 (Supl.1).
49. Maguiña C. La medicina científica occidental, otras alternativas y las plantas medicinales: Una nueva visión. Diagnóstico. 2002;41.
50. WHO consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. WHO/NCD/NCS/99.2; 31-3.
51. Devakumar, C. and SukhDev, in *Neem* (eds Randhawa and Parmar, B. S.), 1996, 2nd edn, pp. 77–110.
52. A. Juss. *Neem, margosa*, SO-ITF-SM-70 New Orleans, LA:US Department of Agriculture, Forest Service, Sothern Forest Experimental Station. 1994. p 65-71.
53. Doharey, K.L.; Singh, R.P. 1989. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernel extracts against chafer beetles. Indian Journal of Entomology. 51(2): 217-220.
54. Cuadernos de Bioética. *Neem, Azadirachta indica* A. Juss. <http://www.salud.bioetica.org/neem.htm> 2011.
55. Cuadernos de Bioética. *Neem, Azadirachta indica* A. Juss. En: <http://www.salud.bioetica.org/neem.htm> 2011.
56. Cuadernos de Bioética. *Neem, Azadirachta indica* A. Juss. En: <http://www.salud.bioetica.org/neem.htm> 2011.
57. Álvarez, O., Esquerre, G. Y Ramírez, M. 1999. *Características Resaltantes de la Especie Forestal Azadirachta indica* A. Juss. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales. Dirección General del Recurso Forestal. Dirección Estatal Ambiental Mérida. División del Recurso Forestal. Mérida, Venezuela.

58. Calderón Córdova L. García Iglesias T. 2011., Exposición por vía oral de Azadirachta indica (Neem) y evaluación de sus efectos tóxicos en ratas wistar. Archivos de Ciencias Vol. 3 (1) 21
59. Fernández Vargas O, García Iglesias T. 2011 Evaluación de la respuesta inmune celular y de citocinas IL-6, TNF-alfa por la exposición vía oral de hojas de Azadirachta indica (Neem) en ratas Wistar. . Archivos de Ciencias Vol. 3 (1) 23