



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Departamento de Análisis Clínicos**

“Estudio del efecto insulino-trópico del extracto de *Stevia rebaudiana* Bertoni como modulador del metabolismo de glucosa y lípidos en ratas wistar expuestas a dieta normal e hipercalórica”

**Tesis presentada como requisito para obtener el título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

Presenta

pQFB Diana Moroni González

Lugar de realización

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Director

D.C. Samuel Treviño Mora

Co-director

D.C Alfonso Daniel Díaz Fonseca



Septiembre de 2016



MTRO. OMAR GERARDO AGUIRRE IBARRA
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 13 de Septiembre de 2016, signado por el Coordinador del Departamento de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

MORONI GONZALEZ DIANA

JURADO

DR. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES
MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ
DR. JOSE ALBINO MORENO RODRIGUEZ

Examen que se realizará el día 22 de Septiembre de 2016, a las 17:00 horas en Salon de Usos Múltiples.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 13 de Septiembre de dos mil dieciseis

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR

**AÑOS DE
AUTONOMÍA
UNIVERSITARIA**

C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

Av. San Claudio y 18 Sur,
Edificio 105-H, Col. San Manuel,
Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

ÍNDICE

1. Marco teórico	12
Nutrición y Balance Nutrimental.....	12
Sobrenutrición, un problema creciente.....	13
Consecuencias de la sobrenutrición	14
Metabolismo normocalórico.	15
Ciclo homeostático de glucosa	17
Metabolismo y catabolismo de lipoproteínas.	18
Funciones clave de Insulina en el metabolismo.....	21
Páncreas, islotes de Langerhans y síntesis de insulina.....	22
Ruta canónica de secreción de Insulina.....	23
Rutas no canónicas de secreción de Insulina.....	23
Insulina y estrés oxidativo	25
Estrategias para combatir el exceso nutrimental, Sobrepeso y Obesidad	27
Edulcorantes no calóricos	28
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni, un edulcorante con potencial	29
2. Definición del problema	32
3. Justificación	33
4. Objetivos	34
Objetivo General	34
Objetivos Específicos.....	34
5. Hipótesis	35
Hipótesis nula	35
Hipótesis alternativa.....	35

7. Diagrama de trabajo	36
8. Materiales y Métodos	37
Métodos	38
Determinaciones Séricas	38
Determinaciones tisulares.....	43
Determinaciones de estrés oxidativo	43
Determinaciones histológicas	45
9. Resultados	47
Efecto del extracto de SrB sobre el metabolismo de lípidos	52
Stevia como reguladora de la distribución del resguardo energético tisular	54
Efecto antioxidante de Stevia rebaudiana Bertoni.....	57
Influencia de SrB en la histología pancreática	63
SrB en la dinámica de expresión-secreción de insulina	65
SrB y su participación en rutas no canónicas de secreción de insulina.	76
10. Discusión	80
Dietas hipercalóricas y sus implicaciones metabólicas tempranas	80
Impacto metabólico tisular de la administración del extracto de SrB	85
Efecto de SrB en la dinámica de expresión-secreción de insulina.....	91
11. Conclusión	100
12. Bibliografía	101
13. Anexos	109
ANEXO #1	109
ANEXO #2	111
ANEXO #3	112
ANEXO #4	114

ANEXO #5	116
ANEXO #6	118
ANEXO #7	121
ANEXO #8	124
ANEXO #9	128
ANEXO #10	130
ANEXO #11	132
ANEXO #13	138
ANEXO #14	139
ANEXO #15	140
ANEXO #16	141
ANEXO #17	143
ANEXO #18	145
ANEXO #19	147
ANEXO #20	150
ANEXO #21	153
ANEXO #22	154
ANEXO #23	156
ANEXO #24	158
ANEXO #25	159

LISTA DE ABREVIATURAS

- OH** Radical Hidroxilo
- O₂** Anión superóxido
- ACAT** Acil-CoA-Aciltransferasa
- ACh** Acetilcolina
- ACS** Acetil coenzima A sintetasa
- ADP** Adenosin difosfato
- AGE** Especies avanzadas de glicosilación
- AGL** Ácidos Grasos Libres
- Agr-1** Proteína de respuesta de crecimiento temprano tipo 1
- ALT** Alanina amino transferasa
- AP-1** Proteína activadora 1
- ARE** Elemento de respuesta antioxidante
- AST** Aspartato amino transferasa
- ATP** Adenosin trifosfato
- AUC** Area bajo la curva
- cAMP** Adenosin monofosfato cíclico
- CAT** Catalasa
- CD36** Cluster de definición tipo 36
- CETP** Proteína transportadora de ésteres de colesterol
- CgA** Cromogranina A
- CREB** Elemento de respuesta y unión a cAMP
- CT** Colesterol Total
- DAG** Diacil glicerol
- DGAT** Glicerol fosfato diacil transferasa
- DM2** Diabetes Mellitus tipo 2
- DNTB** Dinitrocianobenceno
- E2** Estradiol
- eEF2** Factor 2 de elongación eucariótica
- EGFR** Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ENC Edulcorantes no calóricos
eNOS Sintasa del óxido nítrico endotelial
ENSANUT Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERK Cinasa regulada extracelularmente
FDA Administración de drogas y alimentos
FICT Isotiocianato de fluoresceína
FL Fosfolípidos
GLOSARIO
GLUT-2 Transportador de glucosa tipo 2
GLUT-4 Transportador de glucosa tipo 4
GLUT-5 Transportador de glucosa tipo 5
GP Glucógeno fosforilasa
GPAT Glicerol fosfato acil transferasa
GPK Glucogeno fosforilasa cinasa
GPx Glutación peroxidasa
Gq Proteína G que activa a PLC
GS Glucógeno sintasa
GSH Glutación
GSH Glutación reducido
GSK3 Glucogeno cinasa sintasa
GSSG Glutación oxidado
HDL Lipoproteínas de alta densidad
IDA Ingesta diaria admisible
IDL Lipoproteínas de intermedia densidad
IgG Inmunoglobulina G
IL-6 Interleucina 6
IRS Sustrato del receptor de insulina
LCAT Lecitin colesterol acil transferasa
LDL Lipoproteínas de baja densidad
LH Lipasa hepática
LPL Lipoproteín lipasa

MafA Oncogen de fibrosarcoma musculoaponeurítico homólogo de A

MAPK Proteínas cinasas activadas por mitógenos

MDA Malondialdehido

mRNA RNA mensajero

MTF-1 Factor de transcripción regulado por metales

mTOR diana de rapamicina en células de mamífero

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Neuro D1 Diferenciación Neurogenica 1

NF-κB Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NO Óxido nítrico

NOO⁻ Peroxinitrito

NRF2 Factor nuclear eritroide 2 como 2

O Obesos

OMS Organización Mundial de la Salud

p38δ Proteína cinasa activada por estrés tipo δ

PDX-1 Proteína homeobox pancreática y duodenal tipo 1

pH Potencial hidroxilo

PI3K Cinasa de Fosfatidil inositol 3

PKD-1 Proteína cinasa D1

PLC Fosfolipasa C

PLTP Proteína transportadora de fosfolípidos

PPAR-γ Proliferador de peroxisoma activado por receptor gamma

PRTG Proteínas ricas en triglicéridos

QM Quilomicrones

RER Retículo Endopásmico Rugoso

Reα Receptor de estrógenos alfa

Reβ Receptor de estrógenos beta

ROS Especies reactivas de oxígeno

SGLT-1 Cotransportadores acoplados a sodio tipo 1

SM Síndrome Metabólico

SOD Superóxido dismutasa

SP Sobrepeso

SPyO Sobrepeso y Obesidad

SrB *Stevia rebaudiana* Bertoni

Src Protooncogen tisocin proteín cinasa

STZ Estreptozotocina

TAG Triglicéridos

TOG Prueba de tolerancia oral a glucosa

VGCC Canales de calcio dependiente de voltaje

VLDL Lipoproteínas de muy baja densidad

VLDLn Lipoproteínas de muy baja densidad nacientes

VLDLr Lipoproteínas de muy baja densidad remanentes

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Funciones de insulina y glucagon en el metabolismo de la glucosa
- Figura 2.** Ruta canónica de Secreción de insulina
- Figura 3.** Ruta de Secreción de insulina dependiente de p38δ y PKD
- Figura 4.** Acciones de los estrógenos en la biosíntesis y secreción de insulina.
- Figura 5.** Electroferogramas a los 30 y 60 días de los grupos administrados y no administrados con SrB.
- Figura 6.** Efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB en el resguardo de lípidos y glucosa en diversos tejidos.
- Figura 7.** Efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB en el resguardo de lípidos y glucosa en diversos tejidos.
- Figura 8.** Efecto de los diferentes tratamientos por 30 días sobre la histología de los islotes de Langerhans.
- Figura 9.** Efecto de los diferentes tratamientos por 60 días sobre la histología de los islotes de Langerhans.
- Figura 10.** Estudio inmunohistoquímico del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de insulina en ayuno y post-prandio.
- Figura 11.** Análisis inmunohistoquímico del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de Insulina en ayuno y post-prandio.
- Figura 12.** Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de cromogranina en ayuno y post-prandio.
- Figura 13.** Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de cromogranina en ayuno y post-prandio.
- Figura 14.** Análisis inmunohistoquímico del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de PDX-1 en ayuno y post-prandio.
- Figura 15.** Análisis inmunohistoquímico del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de PDX-1 en ayuno y post-prandio.
- Figura 16.** Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de P38δ y PKD-1.
- Figura 17.** Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de P38δ y PKD-1.

Figura 18. Efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de ERK 1/2.

Figura 19. Efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de ERK 1/2.

Figura 20. Efecto de la administración por 30 y 60 días del extracto de SrB en la concentración de estradiol y testosterona.

Figura 21. Efecto de la dieta hiperglúcida hipercalórica sobre el metabolismo y el balance redox tisular a 30 y 60 días de administración

Figura 22. Efecto metabólico y antioxidante de SrB con dieta normocalórica a 30 días y 60 días de administración.

Figura 23. Efecto metabólico y antioxidante de SrB con dieta hiperglúcida-hipercalórica a 30 y 60 días de administración.

Figura 24. SrB como modulador de vías no canónicas de secreción de insulina en condiciones normo e hipercalóricas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de SrB sobre lípidos séricos

Tabla 2. Actividad de Catalasa y Superóxido Dismutasa

Tabla 3. Concentración glutatión reducido, oxidado e índice redox.

Tabla 4. Concentración de malondialdehído y nitritos en diferentes tejidos.

1. MARCO TEÓRICO

Nutrición y Balance Nutrimental

La nutrición es la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2015). Para su estudio, se divide en macro y micro nutrición, cuyo objetivo es garantizar el aporte de macronutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas; y micronutrientes entre los que se encuentran vitaminas y minerales (Jose Caruci, 2006).

El balance nutrimental definido como el consumo adecuado de calorías, macronutrientes y micronutrientes en la dieta, es un estado en el cual todas las necesidades nutricionales se cumplen, sin exceder las necesidades calóricas, lo que garantiza una buena nutrición (dieta idónea y equilibrada combinada con el ejercicio físico regular), la cual es un elemento fundamental de la buena salud. (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2015)

Este balance nutrimental se ve influenciado por diversos factores como hábitos alimenticios, cultura, condiciones sociales, ingreso económico y disponibilidad alimenticia, en este sentido la OMS, afirma que el sistema global de alimentación se ha roto, ya que millones de personas no reciben lo suficiente para comer, y por otro lado, millones de personas consumen demasiados alimentos procesados, lo que desencadena condiciones de malnutrición: como desnutrición, y sobrenutrición en una misma sociedad. (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2015).

Anteriormente, el principal problema alimenticio era la desnutrición, caracterizada por una ingesta calórica insuficiente ante las demandas del organismo, y se daba principalmente en poblaciones con bajo desarrollo, donde las condiciones alimenticias eran pobres y el abastecimiento de comida era ineficaz, comprometiendo el desarrollo de los infantes, ocasionando la disminución de la talla y del índice de masa corporal. Actualmente, las encuestas nacionales, indican que este problema ha logrado reducirse del 10.8% en 1988 a 2.8% en 2012 (ENSANUT, 2012); sin embargo, esto no significa que la población goce de una buena nutrición, ya que las cifras de sobrenutrición son alarmantes y cobran gran importancia.

Sobrenutrición, un problema creciente

Las enfermedades no transmisibles se han convertido en las principales causas globales de morbilidad y mortalidad; siendo uno de sus principales factores de riesgo el alto consumo alimenticio conocido como exceso nutricional. (Mickey Chopra, 2002) De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el exceso de nutrición se refiere a una condición crónica donde la ingesta de alimentos sobrepasa los requisitos de energía alimentaria, lo que resulta *a posteriori* en sobrepeso y obesidad. (OMS, WHO Child Growth Standards, 2005)

El exceso nutrimental se debe principalmente al cambio en el estilo de vida, en el cual, se ven involucrados la mayoría de los países en desarrollo. Por una parte, la gente está siguiendo un patrón de vida sedentario, desde el estado ocupacional o laboral que en su mayoría es sentado y en interiores, al contrario de antaño, cuando el trabajo era manual y al aire libre, además con la implementación y ampliación del transporte, las personas pasan menos tiempo caminando y más tiempo en carro o transporte público. (Wiggins, 2014)

Por otro lado, las personas comen de más, y optan por consumir comida pre-fabricada, en donde el azúcar y la sal son los dos ingredientes más añadidos comúnmente, grasas saturadas y aceites complejos son también agregados en grandes cantidades. (Mickey Chopra, 2002) Las evidencias apuntan a que la comercialización de los alimentos ha influido claramente en el cambio de dieta, las corporaciones transnacionales, tienen desarrolladas marcas globales y estrategias de marketing con la adaptación a los gustos locales y han incursionado nuevos productos que satisfacen las necesidades actuales de la sociedad, que cada vez tiene menos tiempo y dinero para comer, aprovechando además la palatabilidad por alimentos dulces, impactando sobre los mecanismos de saciedad en el organismo y propiciando conductas orexigénicas al consumir alimentos ricos en grasas y carbohidratos (Egger G, 1997). Las procesadoras de alimentos, son además, muy efectivas produciendo comida rápida y botanas, lo que les da la capacidad de vender una porción mayor de estos productos por un menor precio, incrementando con ello el consumo calórico a lo largo de diferentes tipos de poblaciones. (Wiggins, 2014).

Consecuencias de la sobrenutrición

La combinación de cambios en demanda de energía y suministro de alimentos, ha llevado a caracterizar nuevas sociedades afluentes que viven en ambientes obesogénicos: es decir, las circunstancias hacen que sea probable que coman demasiado y aumenten sus pesos corporales (Lang T. a., 2007) (Lang T. , 2009).

Según datos referidos por la OMS, en 2014, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años presentan sobrepeso (SP), de los cuales, más de 600 millones corresponden a obesos (O); lamentablemente el aumento en relación a la prevalencia de obesidad en México, se encuentra entre los crecimientos más rápidos documentados en el plano mundial. Entre 2000 y 2012, este problema aumentó 5.2%, lo que significa que siete de cada diez adultos mexicanos sufre SPyO de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012. (ENSANUT, 2012).

México presenta una de las más altas prevalencias de sobrepeso y obesidad (SPyO) en el mundo, la OMS define al SPyO como una acumulación anormal o excesiva de grasa (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2015). Existe evidencia de que esta condición es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. En el caso de México, el SPyO se asocia con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares, trastornos al aparato locomotor como osteoartritis y algunos tipos de cáncer. (ENSANUT, 2012)

Estas patologías se caracterizan por desarrollar alteraciones en el metabolismo tanto de lípidos como de carbohidratos, que van más allá de la aparición de grandes pliegues en la imagen corporal, en la cual, es el último reflejo en la pérdida de homeostasis en el organismo, ya que sus límites de adaptación fueron sobrepasados ante la cronicidad del exceso calórico, esto, se ve séricamente reflejado por estados dislipidémicos en los que se presentan niveles elevados de triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y ácidos grasos libres (AGL), con disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL), propiciando además condiciones de disglucemia, en las cuales la insulina tiene un papel fundamental (DeFronzo R, 1991) (Facchini F, 1991)

Metabolismo normocalórico.

El organismo mantiene el equilibrio de energía por medio de ciclos de alimentación diarios y a través de periodos en los que la demanda energética aumenta debido al esfuerzo físico, y el agotamiento de dicho suministro se da por la privación de nutrientes. El ciclo de alimentación, se divide en estados de ganancia energética ante la ingesta de alimentos durante el día, y estado de balance energético negativo nocturno ante la privación en la ingesta alimenticia. La capacidad del cuerpo para mantener el equilibrio energético, se centra sobre un conjunto de órganos y tejidos que metabolizan y almacenan nutrientes y energía; siendo los principales páncreas, hígado, tejido adiposo, músculo y tracto gastrointestinal. Los nutrientes ingeridos se absorben, son biotransformados, transportados y ocupados en dependencia de las necesidades del organismo, el remanente energético es almacenado. (Beckerman, 2009)

El metabolismo de carbohidratos, comienza con la digestión oral, donde inicia la degradación del almidón a maltosa, maltotriosa, α -dextrinas y pequeñas cantidades de glucosa. Posteriormente en el duodeno, la amilasa proveniente del páncreas, termina de degradar estos compuestos y mediante maltasa, lactasa, isomaltasa y sacarasa se lleva cabo las últimas degradaciones a monosacáridos, que posteriormente son absorbidos por las células de borde de cepillo del intestino delgado. El transporte de monosacáridos desde el lumen intestinal al enterocito, está dado por los co-transportadores acoplados a sodio tipo 1 (SGLT-1) en el caso de la glucosa, y por transportador de glucosa tipo 5 (GLUT-5) para la fructosa; posteriormente, los GLUT-2 movilizan a la glucosa desde el enterocito a la circulación plasmática. En respuesta al aumento de la glucosa circulante, el páncreas secreta insulina, que sirve como una señal de arranque para diferentes rutas metabólicas en tejidos periféricos. Inicialmente, el hígado toma y almacena la glucosa en forma de glucógeno, realiza rutas de preparación y obtención energética, como lo son glucólisis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, los intermediarios energéticos remanentes entran a rutas lipogénicas como lo es la síntesis de triglicéridos, posteriormente empaquetados en lipoproteínas transportadoras de tipo VLDL (Very Low Density Lipoprotein, por sus

siglas en inglés), que transportan a los triglicéridos hacia tejido muscular y adiposo, principalmente. (Beckerman, 2009)

En el ayuno, los nutrientes son movilizados de las reservas energéticas periféricas, AGL y glicerol proveniente del tejido adiposo blanco, para mantener la homeostasis energética. Reguladores hormonales como el glucagón proveniente de páncreas regulan en parte la movilidad de nutrientes, mientras que dicha señalización en el hígado provoca la biotransformación a los AGL en glucosa, la cual se libera a plasma (gluconeogénesis). Además, glucagón también acciona la vía glucogenolítica, promueve también la oxidación de ácidos grasos, generando cuerpos cetónicos como alternativos energéticos ante la disminución de glucosa; Así mismo, los ácidos grasos y glicerol también proporcionan suministros energéticos a músculo, el cual por rutas oxidativas produce también cuerpos cetónicos, que son utilizados por corazón, pulmones y cerebro. (Beckerman, 2009)

Por otro lado, el sistema nervioso central tiene un rol importante en el mantenimiento y regulación de los procesos metabólicos, por medio de neuroseñalización hacia los tejidos periféricos metabólicamente activos y viceversa. Estas se envían a través de la circulación neuronal y circulatoria (plasmática), llegando a regiones específicas en el cerebro, el cual responde con señales retroalimentadoras. El cerebro ejerce una influencia considerable sobre la alimentación, propiciando estados orexigénicos y anorexigénicos por medio de mensajeros hormonales provenientes de páncreas, tejido adiposo, estómago e intestino, las cuales pasan a través de la barrera hematoencefálica hacia la región del núcleo arcuato, núcleo paraventricular, hipotálamo lateral, núcleo ventromedial y núcleo dorsomedial que es parte del hipotálamo. (Beckerman, 2009)

En condiciones clínicamente sanas en el organismo, la mayoría de estas señales orexigénicas y anorexigénicas son coordinadas por insulina y leptina. Las alteraciones evocadas en el metabolismo varían con cambios a corto, mediano y largo plazo vinculándose a estados alimentarios rápidos y de sobre ingesta, pero también en periodos de larga duración, inicialmente como parte de la estrategia metabólica asociada a estados de salud y enfermedad. (Beckerman, 2009)

Ciclo homeostático de glucosa

Como ya se ha expuesto, en estado de ayuno e hipoglucemia el glucagón es liberado para que el hígado libere glucosa hacia el torrente sanguíneo, por mecanismos de glucogenólisis y/o gluconeogénesis. Por el contrario, ante el incremento de glucosa sanguínea, páncreas responde liberando al medio insulina, lo cual implica que hígado detenga los procesos antes mencionados y comiencen procesos para la reabsorción de glucosa, además de ciclos glucolíticos y glucogénicos para su correspondiente almacenaje, con lo que se puede definir el ciclo homeostático de la glucosa. (Beckerman, 2009)

Un breve esquema de la cadena de eventos que conducen a la conversión y almacenamiento de glucosa en el hígado se presenta en la figura 1. Como se muestra, la glucosa se convierte secuencialmente a glucosa-6-fosfato (por glucosa cinasa) → glucosa-1-fosfato (por una enzima mutasa). Dos enzimas controlan las interconversiones entre la glucosa-1-fosfato y glucógeno. Una de éstas, es la glucógeno sintasa (GS), la cual cataliza la formación de glucógeno a partir de glucosa-1-fosfato. Esta enzima se inactiva cuando se fosforila y se activa cuando se desfosforila. Otra enzima, la glucógeno fosforilasa (GP) cuando está fosforilada cataliza la conversión de glucógeno en glucosa-1-fosfato. La insulina y el glucagón actúan como reguladores de estos procesos, denominándose “switchs bioquímicos” (Fig.1)

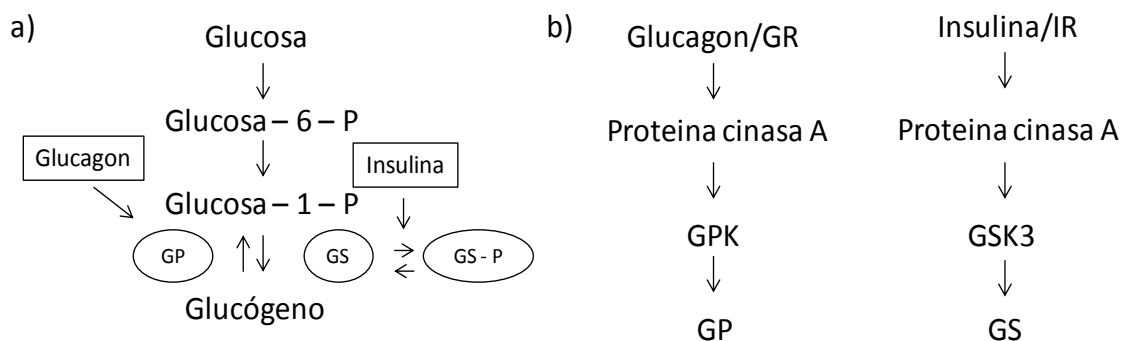


Figura 1. Funciones de insulina y glucagón en el metabolismo de la glucosa. Tomado y modificado de Martin Beckerman, Cellular Signaling in Health and Disease, biological and medical physics.

Metabolismo y catabolismo de lipoproteínas.

Una vez saturado el sistema de resguardo de glucógeno, insulina en hígado promueve la lipogénesis de *novo*. En donde el hígado sintetiza continuamente triglicéridos (TAG), a partir de 2 fuentes: 1) Reesterificando los AGL tomados del plasma con glicerol y 2) A partir de Acetil-CoA proveniente principalmente de hidratos de carbono. Estos TAG son secretados en forma de VLDL nacientes (VLDLn), esto impide su acumulación en hígado, (esteatosis). Las VLDL están constituidas por las proteínas Apo-B100, Apo-C y Apo-E, moléculas que son sintetizadas por los ribosomas del RER. En plasma esta lipoproteína recibe más Apo-C (en especial Apo-CII) por parte de las HDL, convirtiéndose en VLDL “maduras” transformándose en el sustrato ideal para interaccionar con la lipoproteín lipasa (LPL) que se encuentra en la superficie del endotelio capilar, LPL hidroliza TAG (en presencia de la tríada de activación) con lo que produce los remanentes de VLDL (VLDLr) que se dirigen al hígado para su catabolismo. (Erez F. Scapa, 2002)

Mismo proceso tiene lugar en los Quilimicrones (QM), a medida que va actuando la enzima LPL se pierden algunos lípidos y apoproteínas y otros son transferidos a las HDL por medio de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP). Las VLDLr pueden seguir 2 caminos: 1) Ser endocitadas por las células hepáticas tras unirse a los receptores específicos por medio de la Apo-E, con la posterior degradación de sus componentes. 2) Permanecer en el plasma continuando su catabolismo por acciones sucesivas de las LPL-1, perdiendo más TAG y consecutivamente contenido de Apo-C, dando como resultado a las lipoproteínas de densidad baja intermedia (*Intermediate Low density lipoprotein* por sus siglas en inglés IDL). Posteriormente, sobre las IDL actúa la isoforma LPL-2 sobre el resto de los TAG. La LPL-2 o lipasa hepática (LH) no precisa de Apo-CII como cofactor, por lo que el resultado de esta reacción enzimática es la formación de la fracciones de baja densidad (LDL), de menor tamaño que la VLDL, con alto contenido en colesterol y bajo en TAG, y con un contenido apoproteico casi exclusivo en Apo B100. (Goldberg, 1996)

En el postprandio aumenta progresivamente la concentración de IDL en el plasma. Las LDL's por su parte, se encarga de acarrear el colesterol a los tejidos periféricos donde es requerido, para ello es reconocida por diversas células del organismo por medio de receptores específicos que permiten regular el equilibrio intracelular del colesterol. (Erez F. Scapa, 2002)

Los estudios realizados por Goldstein y Brown en cultivos de fibroblastos humanos, permitieron conocer el tipo de degradación de las LDL y explicar el defecto de la hipercolesterolemia familiar. Estos investigadores comprobaron que el catabolismo de la LDL es mediado por receptores de membrana sensibles a la Apo-B. Estos receptores extra hepáticos se ligan a la LDL por intermedio de las Apo-B pero también son aptos para unirse a la Apo-E; es por eso que se los denomina receptores B/E (receptores duales). Una prueba de ello es la capacidad de unión de HDL rica en Apo-E a estos receptores. Después de unirse a su receptor, la LDL es internalizada incorporándose a las células por endocitosis. La vesícula endocítica es atacada por las enzimas hidrolíticas de los lisosomas. El componente proteico es degradado a aminoácidos y los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa ácida, la colesterol éster hidrolasa que actúa a pH 4, generando colesterol libre. Este es utilizado para la síntesis de membranas celulares, pero principalmente tiene tres funciones reguladoras: 1) Inhibe la Enzima 3-hidroxi-3metil-Glutaril-CoA-Reductasa, que es la enzima clave en la síntesis del colesterol. 2) Activa a la Enzima Acil-CoA-Aciltransferasa (ACAT) que reesterifica el colesterol para su almacenamiento en forma de ésteres de colesterol. 3) Inhibe la síntesis de más receptores para la LDL. Estas acciones reguladoras previenen la sobrecarga de colesterol en las células. Para ser liberado de la célula el colesterol esterificado es hidrolizado por la enzima colesterol éster hidrolasa que actúa a pH 7. En los últimos años cobró mucha importancia como "scavenger" o vía alternativa de degradación de LDL, por la cual la lipoproteína es tomada por los macrófagos por medio de receptores diferentes; no específicos B/E. Estos macrófagos toman la LDL, la digieren y aproximadamente la mitad del colesterol queda depositado en el espacio citoplasmático apreciándose en el microscopio electrónico como células espumosas. Este camino constituye el 15 % de la

degradación de las LDL, siendo la vía predominante en el caso de la hipercolesterolemia familiar homocigota. (Erez F. Scapa, 2002)

Por su parte las HDL, que son sintetizadas y secretadas por el hígado e intestino, estas representan un grupo heterogéneo de partículas, las HDL2 que son las de mayor tamaño en comparación a las HDL3 que son más pequeñas. También se conoce otra subfracción: la HDL1 o HDLc o Apo-E HDLc, que por su tamaño y densidad es similar a la subfracción HDL2 difiriendo con esta solo en la afinidad por los receptores de la LDL, debido a que las partículas de HDL carecen de Apo-E. La HDLc se encuentra tanto en animales con alto contenido en colesterol y grasas saturadas. Las HDL tienen como función: 1) constituir el reservorio de Apo-C y Apo-E, necesarias en el metabolismo de las proteínas ricas en triglicéridos (PRTG). 2) Transportar el colesterol de los tejidos periféricos al hígado, esto se conoce como “Transporte Reverso de Colesterol”. (Goldberg, 1996)

Finalmente, se puede mencionar que estas lipoproteínas que son secretadas en forma de HDL nacientes (HDLn), son partículas discoidales compuestas por una bicapa de fosfolípidos y colesterol libre rodeada de Apo-A (en especial de AI y II), Apo-E y Apo-C. Cabe aclarar que las HDLn de origen intestinal no contienen Apo-C y Apo-E. La Apo-C es sintetizada en el hígado y transferida a las HDL intestinales cuando éstas entran al plasma. Son lipoproteínas de suma importancia e impacto metabólico ya que actúan como “capacitadoras” de las VLDL, además juegan un rol cooperativo en la inducción de óxido nítrico endotelial (eNOS) compartiendo rutas de actividad con insulina. Y en situaciones de sobre inducción de formación de las fracciones de muy baja densidad, las apoproteínas que conforman a las HDL disminuyen en producción y síntesis, por lo que su concentración plasmática tiende a decrecer, por lo que las proteínas de alto transporte en TAG permanecen por más tiempo, lo cual constituye uno de los principales marcadores de disfunción metabólica o síndrome metabólico (SM). (Erez F. Scapa, 2002)

Respecto al intercambio lipídico en el cual también participan activamente, una vez que se encuentran en el plasma, sobre las HDL actúa la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT). Esta enzima, se incorpora a una fracción de las HDL y en presencia de Apo-AI como cofactor, esterifica el colesterol libre de la superficie de la lipoproteína. Este colesterol esterificado se ubica en el centro de la partícula convirtiendo su forma discoidal o naciente en esférica o madura representado por las HDL2 (más grandes, menos densas y ricas en colesterol esterificado). El colesterol recién esterificado es distribuido hacia las PRTG y recibiendo a cambio TAG, todo esto es mediado por la CETP, este proceso tiene por objeto enriquecer levemente a las HDL en TAG permitiendo así la acción de la LH (que ataca los TAG del interior de las HDL) esto induce el remodelado de las HDL; las HDL2 se transforman en HDL3. Las HDL3, por su tamaño más pequeño, son más aptas para atravesar la pared de los capilares sanguíneos y recaptar el colesterol excedente desde los tejidos periféricos, que nuevamente por acción de la LCAT se forma colesterol esterificado que se localizará en el centro de la partícula, regenerándose HDL2. De este proceso dinámico resulta un continuo intercambio de colesterol, desde las HDL a las PRTG, promoviendo el desplazamiento de ese colesterol al hígado para que pueda hidrolizarse y excretarse como ácidos biliares o incorporarse a otras lipoproteínas hepáticas. De esto se deduce el rol antiaterogénico de las HDL. Por último, no puede dejarse de mencionar otra fracción de HDL que solo contiene Apo-E o HDLc. Se origina por dietas ricas en colesterol. Esta HDLc tiene como función redistribuir el colesterol a los tejidos periféricos que posean receptores B/E o llevar el colesterol directamente al hígado para su excreción (Goldberg, 1996).

Funciones clave de Insulina en el metabolismo

La insulina es una hormona que regula diversos procesos metabólicos en el organismo, por ejemplo, aumenta el transporte de glucosa a través de las membranas en tejido muscular y adiposo mediante la activación de la vía que permite la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4, promueve también la glucólisis al estimular la actividad de hexoquinasa y 6-fosfofructoquinasa. Promueve la síntesis de glucógeno en hígado, adiposo y músculo con lo que inhibe la

gluconeogénesis y glucogenólisis en hígado y detiene la lipólisis en tejido adiposo, regulando de manera favorable los niveles de AGL en plasma; activa también la síntesis de TAG en diversos tejidos e incrementa la formación de colesterol VLDL en hígado, con lo que les permite su tránsito hacia tejidos, además disminuye la velocidad de oxidación de AGL en músculo e hígado. Por otro lado, se ha descrito que incrementa el transporte de algunos aminoácidos y la velocidad de síntesis de proteínas en músculo, hígado, adiposo y otros tejidos, disminuyendo la velocidad de degradación de proteínas en estos. (Dimitriadisa, 2011)

Páncreas, islotes de Langerhans y síntesis de insulina

El páncreas es un órgano de forma cónica, dividido anatómicamente en cabeza, cuello, cuerpo y cola. En los humanos, su tamaño oscila entre 15-23 cm con 4-5 cm de grosor y 70-150 g. La cabeza se localiza en la concavidad del duodeno formada por las primeras tres porciones del duodeno. Consta de una parte exocrina compuesta por células acinares encargadas de producir y secretar enzimas que promueven la digestión como tripsina, quimiotripsina, lipasa, colipasa y amilasa pancreática entre otras, y una parte endócrina compuesta por islotes de Langerhans los cuales son la unidad anátomo funcional del páncreas endócrino. (Islam, 2015)

Los islotes de Langerhans representan el 1% del peso total del órgano y se componen mayoritariamente de células β productoras de insulina, α de glucagón, y menores proporciones de células δ donde se sintetiza somatostatina y péptido PP que fabrican el polipéptido pancreático. Los islotes, están inervados por el sistema nervioso autónomo y tienen una fina red vascular que los dota de un sistema venoso tipo portal, orientado desde las células beta, hacia alfa y delta. (Islam, 2015)

La secreción de insulina, está regulada directamente por el metabolismo, por lo que tiene suma importancia en los pacientes con desregulaciones metabólicas; se sintetiza en las células β de los islotes de Langerhans, a partir de un mRNA que se traduce y genera un péptido llamado preproinsulina, este péptido se transloca al retículo endoplásmico rugoso (RER), en donde se elimina la secuencia señal, y el péptido se pliega seguido por la formación de tres puentes disulfuro que confieren su estructura nativa, a este nuevo péptido se le denomina proinsulina, y es transportado hacia el

aparato de Golgi, donde dentro de las vesículas secretorias, se escinde el péptido C, y se almacenan insulina madura, junto con proporciones pequeñas de proinsulina intacta, hasta la señal de liberación. (Seino S, 2008)

Ruta canónica de secreción de Insulina

La célula beta (β) posee un sistema único de transducción de señales dependiente del metabolismo que activa la secreción de insulina, así al entrar glucosa a la célula vía GLUT2, ésta es sometida a procesos de glucólisis cuya finalidad es obtener ATP, cuando la proporción ATP/ADP es mayor, se cierra el canal de potasio ATP dependiente, lo que depolariza la membrana y abre los canales de calcio (Ca^{2+}) voltaje dependientes (VGCC), aumentando la concentración intracelular de Ca^{2+} , quien promueve la movilización de las vesículas y su fusión con la membrana plasmática, liberando a torrente circulatorio insulina y péptido C. (Seino S, 2008) (Fig 2)

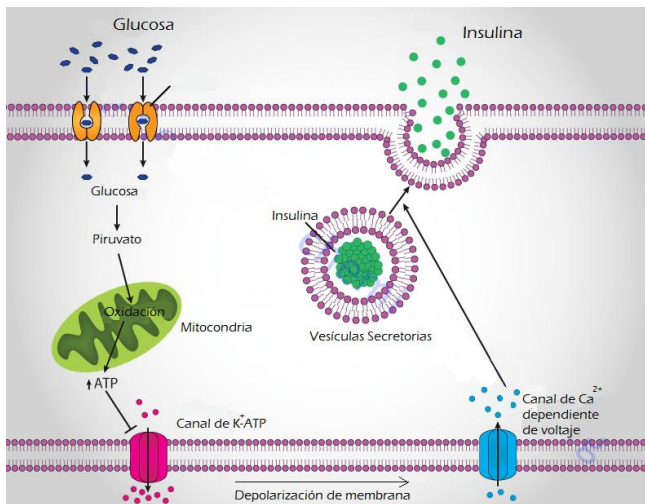


Figura 2. Ruta canónica de Secreción de insulina

Rutas no canónicas de secreción de Insulina

Además de la vía principal para secreción de insulina, existen otras vías y factores que tienen un papel importante en la liberación de la hormona, por ejemplo, la vía dependiente de p38 δ /PKD-1.

p38 δ , también conocido como SAPK4 o MAPK13, es un miembro de la familia p38MAPK y es una proteína cinasa activada por estrés, cuyas funciones van desde la fosforilación de la proteína Tau para la regulación de la dinámica de microtúbulos hasta

la fosforilación e inactivación de proteínas como eEF2 (Factor 2 de elongación eucariótica) y PKD-1 (Proteína cinasa D1). Recientemente, se ha implicado a p38δ en regeneración tisular, cáncer y enfermedades metabólicas, colocándolo como un buen blanco para nuevas estrategias terapéuticas; de tal modo que p38δ, parece ser un regulador de procesos relacionados con la patogénesis de diabetes, secreción de insulina, y la muerte de células β. Sumara et al., (2009), observaron que en un modelo knockout a p38δ, ante un aumento de estrés oxidativo provocado por estreptozotocina (STZ), los niveles de glucosa disminuían mientras que los de insulina y PKD-1 activo aumentaban, respecto del modelo “wild type”; PKD-1 es conocido por ser un regulador positivo tanto para la sobrevivencia de células β, al activar NF-κB, como para la liberación de insulina al regular el tráfico vesicular; esta vía es independiente del metabolismo de glucosa, los canales de K_{ATP}, y los flujos de Ca²⁺. (Sumara G, 2009) (Nebreda, 2009) (Risco, 2012) (Fig. 3)

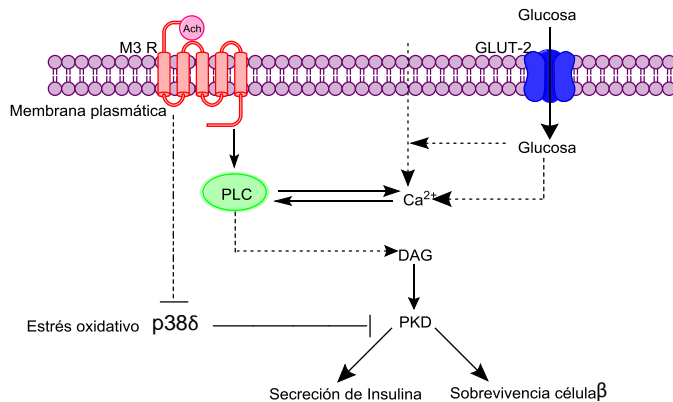


Figura 3. Ruta de Secreción de insulina dependiente de p38δ y PKD (Modificado de Sumara et. al. 2009)

Los agonistas de los receptores de estrógenos, han emergido como moléculas importantes en la homeostasis de la glucosa, se conoce que el receptor de estrógenos alfa (REα), está implicado en la sobrevivencia de la célula β al inhibir la actividad de caspasa 3 y 7, y la apoptosis inducida por H₂O₂, este receptor regula además la biosíntesis de insulina, al inducir la vía Src/ERK, lo que conlleva a la translocación y unión del factor de transcripción NeuroD1 al promotor del gen de insulina. Por su parte, el receptor de estrógenos β (REβ), interviene con la liberación de insulina, induciendo una mayor actividad de la glucocinasa con lo que el ratio ATP/ADP se incrementa más rápido, además, reduce rápidamente la actividad del canal de K_{ATP}, dando lugar a la

despolarización de la membrana, que seguido del flujo de calcio evoca la movilización de vesículas y finalmente la secreción de insulina (Alonso-Magdalena P, 2008) (Tiano J, 2012); un mecanismo similar, se ha descrito para las sulfonilureas (Panten U, 1996), que es un fármaco empleado en el tratamiento de diabéticos, y para *Stevia rebaudiana* Bertoni (SrB), un edulcorante no calórico emergente; sin embargo la teoría para SrB fue refutada por Jappesen et al., en 2000 y hasta la fecha no se ha determinado su mecanismo de acción. (Jeppesen P, 2000) (Mauvais-Jarvis, 2012) (Fig. 4)

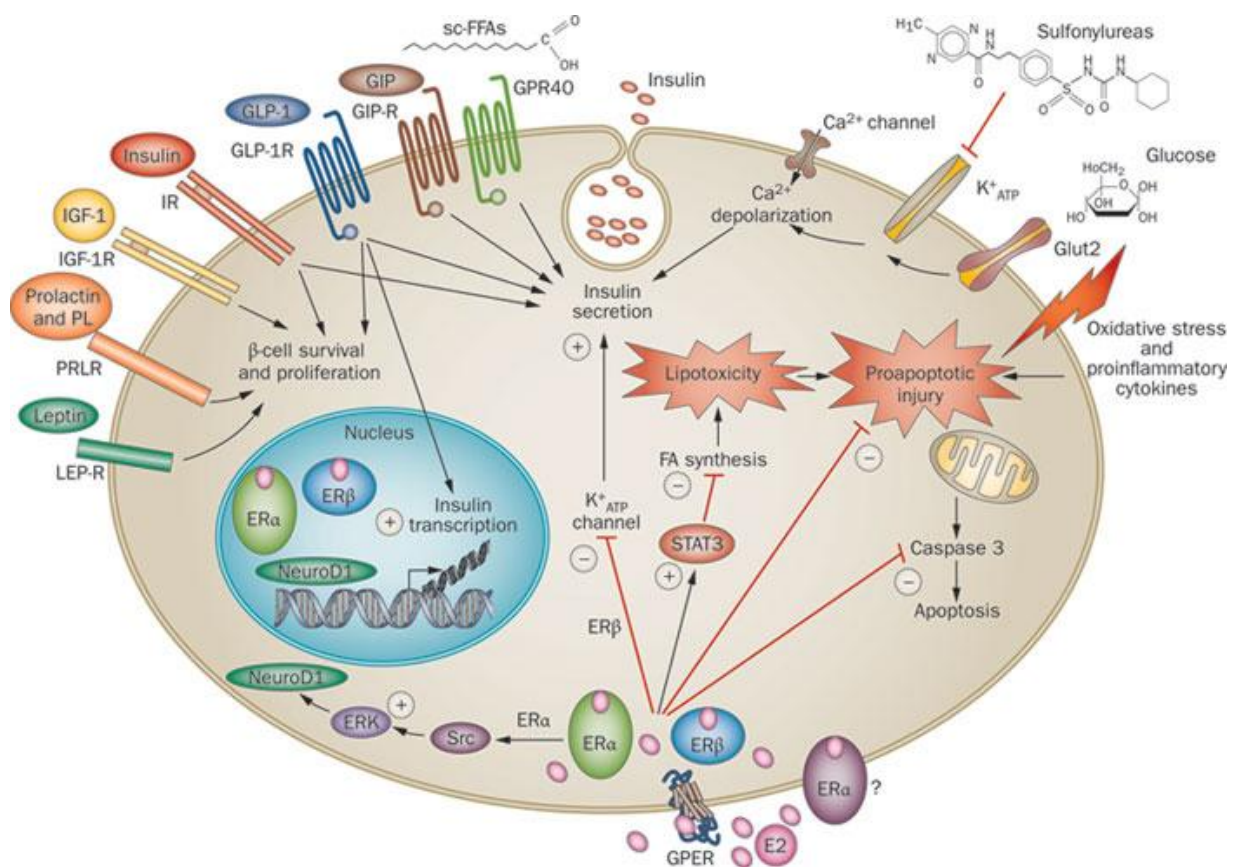


Figura 4. Acciones de los estrógenos en la biosíntesis y secreción de insulina. (Tomado de Tiano y Jarvis. 2012)

Insulina y estrés oxidativo

Bajo condiciones normales, la insulina promueve una cascada de señalización en tejidos dependientes a ésta (músculo, adiposo y corazón), que culminan en la translocación de transportadores de glucosa tipo 4 (GLUT4). La glucosa transportada al interior de la célula es utilizada en diferentes vías metabólicas en dependencia de la necesidad tisular. La insulina, posee además la capacidad de modular rutas

catabólicas y anabólicas de lípidos y carbohidratos como se mencionó anteriormente, estas rutas metabólicas involucradas en el resguardo y obtención energética implican procesos citosólicos y mitocondriales durante los cuales se producen un número importante de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies radicalarias, como el radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$), que posee una gran capacidad para oxidar membranas, o conjugarse y formar otros radicales más agresivos como el peroxinitrito (NOO^\cdot), o el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). La producción de estas especies reactivas de oxígeno (ROS) está regulada por una serie de enzimas antioxidantes entre las que encontramos a superóxido dismutasa (SOD), que conjuga al $\cdot\text{O}_2^-$ con hidrogeniones provenientes de la ATPasa (H^+) para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y quien a su vez es tomado por otras enzimas antioxidantes, como glutatión peroxidasa y catalasa (CAT), que lo degrada en H_2O y O_2 . Cuando este sistema es insuficiente puede actuar simultáneamente una defensa antioxidante dada por glutatión (GSH), que al oxidarse por ROS se convierte de glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG). (Seino S, 2008) (Pi J, 2010)

Cuando existen desregulaciones metabólicas, el balance entre enzimas antioxidantes, y la producción de ROS, se pierde, promoviendo en la célula un ambiente de estrés oxidativo, que tiene implicaciones a nivel de DNA, proteínas y oxidación de los lípidos de las membranas.

El estrés oxidativo, ocupa un rol central en patologías como sobrepeso, obesidad y diabetes, en las cuales exacerba sus complicaciones secundarias. En el caso de diabetes, la hiperglucemia crónica, es la mayor fuente de radicales libres debido su oxidación, en esta se producen cetoaldehidos reactivos y radicales de anión superóxido, que a su vez llevan a la formación de peroxinitritos al reaccionar con óxido nítrico o peróxido de hidrógeno, formando también radical hidroxilo. Estos radicales superóxido tienen la capacidad de oxidar a su vez LDL, transformándolas en especies altamente aterogénicas. Además, la glucosa interactúa con proteínas, produciendo productos de glicosilación avanzada (AGE), quienes no solamente inactivan la función de algunas enzimas, si no que promueven la formación de más radicales libres, desencadenando procesos de inflamación y daño celular, especialmente en las células β al activar NF- κ B. La sobreproducción de ROS ocasiona adicionalmente

enfermedades microvasculares y macrovasculares. El corazón es uno de los más afectados, como resultado del incremento en la oxidación de ácidos grasos libres y la resistencia a insulina. En este la vía PKC se estimula a consecuencia de ROS, jugando un rol importante en el desarrollo de aterosclerosis, cardiomiopatía, disminución de la reserva de óxido nítrico (NO), sobreexpresando al inhibidor del plasminógeno por fosforilación de diversas proteínas blanco y cuya actividad es dependiente de iones Ca^{2+} , fosfatidilserina, y diacilglicerol (DAG). (Bansal, 2014)

Estrategias para combatir el exceso nutrimental, Sobrepeso y Obesidad

Debido a las implicaciones que tienen en la calidad de vida de las personas las patologías relacionadas con el SPyO, a nivel mundial y nacional, se han desarrollado estrategias para combatirlos entre las cuales destacan:

1) El fomento a una alimentación saludable, que incluye:

- Lograr un equilibrio energético y un peso normal
- Limitar la ingesta energética procedente de las grasas, sustituir las grasas saturadas por grasas insaturadas y tratar de eliminar los ácidos grasos trans
- Aumentar el consumo de frutas y hortalizas, así como de legumbres, cereales integrales y frutos secos
- Limitar la ingesta de azúcares libres
- Limitar la ingesta de sal (sodio) de toda procedencia y consumir sal yodada.

2) Promover una mayor actividad física:

Se recomienda que las personas se mantengan suficientemente activas durante toda la vida. Según el tipo y la intensidad de la actividad física se logran diferentes resultados de salud: al menos 30 minutos de actividad regular de intensidad moderada con una frecuencia casi diaria, reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de diabetes, así como de los cánceres de colon y de mama. (OMS, Estrategia mundial sobre régimen alimenticio, actividad física y salud, 2004).

Un punto importante sobre estas acciones es la limitación en la ingesta de azúcares libres, ya que según la encuesta en 2012 de la International Food Information Council Foundation (IFICF por sus siglas en inglés), 51% de las personas tratan de limitar el

consumo de azúcar, a un 30% le interesa seguir una dieta saludable, para un 41% es una opción sólo para diabéticos, y otro 40% reconoce que le ayuda a controlar su peso y salud, (IFICF, 2012); del porcentaje de la población que intenta limitar el consumo de azúcar se reconoce dos poblaciones: la que disminuye el consumo de azúcar y mantiene una dieta normocalórica, y la que para lograrlo, añade a su dieta edulcorantes no calóricos (ENC) o de alta intensidad según la FDA. (FDA, 2014)

Edulcorantes no calóricos

Los ENC surgieron como una alternativa económica y comercial y son sustancias o aditivos alimentarios que confieren sabor dulce a los alimentos, debido a que son muchas veces más dulces que el azúcar de mesa (sacarosa), se necesitan cantidades más pequeñas de éstos para conseguir el mismo nivel de dulzor en los alimentos, a diferencia del azúcar no aportan calorías al organismo, y carecen de efecto sobre los niveles de glucosa en sangre. (FDA, 2014)

En nuestro país están regulados para su consumo por la COFEPRIS, y deben cubrir los requisitos de seguridad para su Ingesta Diaria Admisible (IDA) sin aportar un riesgo para la salud (Cofepris, 2012). Los ENC son una alternativa que se adapta a las circunstancias actuales para obtener alimentos y bebidas que satisfagan las necesidades de una población cambiante. Por lo que, su consumo tiene beneficios adicionales.

El crecimiento del consumo en hogares de ENC se estima que alcanza un ritmo del 20 al 25% anual. La industria en prácticamente cuatro años ha duplicado la cantidad de productos elaborados/endulzados/preparados con ENC, por lo que la tendencia de desarrollo de estos productos se estima elevada. Este esfuerzo no sólo se ha hecho en caramelos o bebidas, sino ya en todas las categorías como lácteos, confitería, cereales y otros como aderezos, mermeladas y jaleas.

Algunos de los ENC que se encuentran en el mercado son la Sacarina, Aspartame, Acesulfame K, Sucralosa, Neotame y Stevia, de los cuales éste último ha cobrado gran popularidad debido a su origen natural.

Los ENC, al ser productos relativamente nuevos, han sido partícipes de un sinnúmero de polémicas relacionadas con la percepción del riesgo que puedan representar. Esto,

ha ocasionado que el consumidor reciba gran cantidad de información confusa que no le permite tomar decisiones adecuadas.

El reto de la industria es reemplazar el azúcar por ENC, pues las preferencias gustativas tienen gran influencia por lo dulce, con lo que se plantea la necesidad de hallar o diseñar un ENC ideal y, por tanto, los estudios en este ámbito cobran gran importancia.

***Stevia rebaudiana* Bertoni, un edulcorante con potencial**

La stevia o ka'a he'ẽ (*Stevia rebaudiana* Bertoni), es una especie del género *Stevia* de la familia de las Asteráceas nativa de Paraguay, ha sido empleada desde hace mucho tiempo en infusiones para diabéticos, debido a sus propiedades hipoglucemiantes (Curi R, 1986) (Soejarto D, 1982); además es un ENC, cuya capacidad supera 300 veces la del azúcar común, lo que ha llevado a que se desarrollen muchos productos para diabéticos utilizándola como sustituto de azúcar común.

Cofepris, ha determinado para los glucósidos de Steviol una IDA que va desde 40 mg/Kg para fruta cristalizada, hasta 2500 mg/Kg en suplementos alimenticios y 3500 mg/Kg en goma de mascar; en el caso de bebidas saborizadas, café, té y sus derivados lo coloca en 200 mg/L, y para alimentos dietéticos para usos médicos especiales, lo establece en 350 mg/Kg; sin embargo, para el caso de sustitutos de azúcar, incluyendo aquellos que ya contienen otros edulcorantes potentes, no establece un límite numérico, sino que lo somete a BPF (buenas prácticas de fabricación), es decir que la cantidad de un aditivo que se añade a un producto, debe limitarse a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado, a condición de que no altere la naturaleza, sustancia o inocuidad del producto, con lo que el rango de concentraciones es demasiado (depende de quien la interprete) (Cofepris, 2012)

Acorde a los estudios realizados, la porción de mayor uso de la planta de SrB son las hojas, las cuales contienen glucósidos de steviol, proteínas, fibras, carbohidratos, fósforo, hierro, calcio, potasio, sodio, magnesio, flavonoides, zinc, vitamina C y vitamina A (Kim, 2012). Dentro de los glucósidos de steviol, el rebaudiósido A y el esteviósido son los dos principales glucósidos que se encuentran en SrB, se han caracterizado por espectroscopia infrarroja y son quienes confieren su potencial

edulcorante. Entre las 230 especies del género *Stevia* sólo las especies *rebaudiana* y *phlebophylla* producen glicósidos de esteviol (Brandle J, 2007).

Se han realizado diversos estudios tanto en modelos murinos con diabetes inducida por aloxano o STZ, como en cultivos celulares que muestran otras propiedades de SrB. Actividad antioxidante, evidenciada por la disminución de lipoperoxidación y el aumento de la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GSH y glutatión peroxidasa (GPx) en páncreas, hígado y riñón; (Shivanna N, 2013), (Sunanda Singh, 2013), (Singh, 2014) (Sharma R, 2012) (Il-Suk Kim, 2011). Hipoglucemiante, al disminuir los niveles séricos de glucosa en sangre, mejorar la tolerancia a glucosa y la sensibilidad a insulina; (Shivanna N, 2013), (Sunanda Singh, 2013), (Singh, 2014). Protector renal, al aumentar la tasa de filtrado glomerular, y disminuir los niveles de γ -glutamyl transpeptidasa, glucosa-6-fofato deshidrogenasa, creatinina y urea séricas; (Shivanna N, 2013). Actividad hepatoprotectiva, ya que disminuye los niveles de aspartato amino transferasa (AST) y alanina amino transferasa (ALT) y aumenta los niveles de glucógeno respecto al daño ocasionado por STZ y aloxano (Shivanna N, 2013), (Sunanda Singh, 2013). Hipolipidémico, debido a que disminuye los niveles séricos de colesterol total (CT), TAG, LDL y VLDL y aumenta los niveles de HDL (Singh, 2014; Sunanda Singh, 2013). Actividad antimicrobiana (Sumit G, 2008; Jayaraman S; Tomita T, 1997).

Así mismo se ha estudiado el efecto insulínico de SrB ya que estimula la secreción de esta hormona, actualmente se desconoce el mecanismo por el cual lo realiza; primeramente se describió que tenía un efecto directo sobre el canal de K_{ATP} , tal como lo realizan las sulfonilureas, sin embargo trabajos realizados en 2002 por Jappesen et al., demostraron que el mecanismo por el cual SrB induce una mayor secreción de insulina es independiente del cierre del canal de potasio, flujos de calcio, concentraciones de glucosa, así como de estímulos promovidos por AMPc. mismos que median las concentraciones adecuadas de insulina. (Jeppesen P, 2000; Shivanna N, 2013; Chen J, 2006; Reziwanggu Abudula, 2004; P.B. Jeppesen, 2000).

Actualmente, en el mercado se pueden encontrar diversas presentaciones de *Stevia*, que van desde la planta como tal, las hojas secas, el extracto acuoso y hasta cristales en sobres para añadir directamente a comidas y bebidas. De algunos productos se

han realizado estudios de genotoxicidad, no obstante su seguridad aún se encuentra en controversia probablemente debido a que esta información es escasa. Sin embargo, se le ha conferido a los glicósidos de esteviol cierto grado de toxicidad, que se halla asociada a la concentración, frecuencia de consumo y tiempo del mismo (Sakaki et al., 2002; Sekihashi et al., 2002; Brusick, 2008; Williams and Burdock, 2009). Esto hace que SrB en sus diferentes presentaciones sea de interés particular en diferentes áreas de investigación metabólica, farmacológica y alimenticia.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El exceso nutrimental basado en el consumo de productos con características hipercalóricas, y estilos de vida sedentaria han producido un incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en nuestro país y el resto del mundo, según la Encuesta Nacional de Salud (2012) (ENSANUT, 2012), y la Organización de Naciones Unidas para la agricultura y Alimentación (FAO), 73% de la población tiene sobrepeso y 69.4% obesidad. Dicha situación ha sido aprovechada por la industria naturista y farmacéutica para introducir en el mercado una gran variedad de productos auxiliares en la pérdida de peso o control metabólico de carbohidratos y lípidos, como una alternativa no farmacológica, por lo cual se ha promovido en la población el uso de edulcorantes no calóricos, para sustituir el consumo de azúcares complejos, sin embargo, muchos de ellos han mostrado efectos adversos como desregulaciones metabólicas, y presentan también problemas de aceptación en la población, por lo que, industrialmente se han enfocado sobre el diseño de edulcorantes no calóricos que actúen de manera ideal, ante lo cual *Stevia rebaudiana* Bertoni (SrB) ha tomado mucha popularidad por las importantes propiedades que posee, a pesar de no conocer con exactitud su mecanismo de acción o rutas metabólicas en las que participa o interfiere.

Por lo que se plantea la siguiente pregunta científica:

¿Es *Stevia rebaudiana* Bertoni un insulinotrópico capaz de modular el metabolismo de glucosa y lípidos en ratas Wistar expuestas a una dieta normo e hipercalórica?

3. JUSTIFICACIÓN

México enfrenta una crisis de salud pública a causa del sobrepeso y la obesidad con un costo entre los 82 y 98 mil millones de pesos que equivalen a 73% y 87% del gasto programable en salud (2012), sólo considerando los costos atribuibles por diabetes.

Aunado a esto, el 30% del presupuesto de los hogares mexicanos se invierte en comidas y bebidas endulzadas, según un informe de la encuestadora Kantar WorldPanel. Este tipo de alimentos recientemente tienen más impuestos en un esfuerzo del gobierno por reducir las altas tasas de obesidad que hay en México; alarmantemente los hogares han dejado de gastar en productos de higiene y cuidado personal para poder invertir el ahorro en comida procesada o chatarra.

Por lo que estrategias no farmacológicas se han puesto de moda en el mercado, el uso de edulcorantes no calóricos, como coadyuvantes en la prevención y tratamiento de padecimientos metabólicos, constituye un excelente soporte en el manejo de carbohidratos. SrB es un ENC utilizado actualmente de forma indiscriminada, desarrollándose múltiples productos alimenticios a base de SrB con cantidades bajas de calorías, los cuales son consumidos libremente tanto por la población diabética, como por la población en general, que intenta moderar su ingesta de azúcar.

Existen estudios en modelos murinos y en cultivos celulares que describen algunas propiedades de SrB, como son, protector renal, antidiabético, hipolipemiante, anti caries, antioxidante e insulino-trópico, entre otras. Sin embargo, aún es desconocido el mecanismo por el cual SrB posee esta última característica y los efectos secundarios que puede ocasionar, por lo que en el presente estudio se pretende contribuir a dilucidar el mecanismo de acción y los probables efectos secundarios que pudiese tener sobre tejido pancreático, debido al efecto insulino-trópico que presenta.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer el efecto por el cual *Stevia rebaudiana* Bertoni actúa como insulínico y su impacto en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en ratas Wistar expuestas con dieta normo e hipercalórica.

Objetivos Específicos

En modelos tanto metabólicamente regulados como desregulados, (Lípidos y Glucosa):

- Evaluar el efecto de SrB en el manejo de lípidos y carbohidratos
- Valorar si SrB influye en la dinámica de expresión-secreción insulínica en ayuno y post-prandio.
- Identificar moléculas clave de rutas no canónicas relacionadas con la secreción de insulina.

5.- HIPÓTESIS

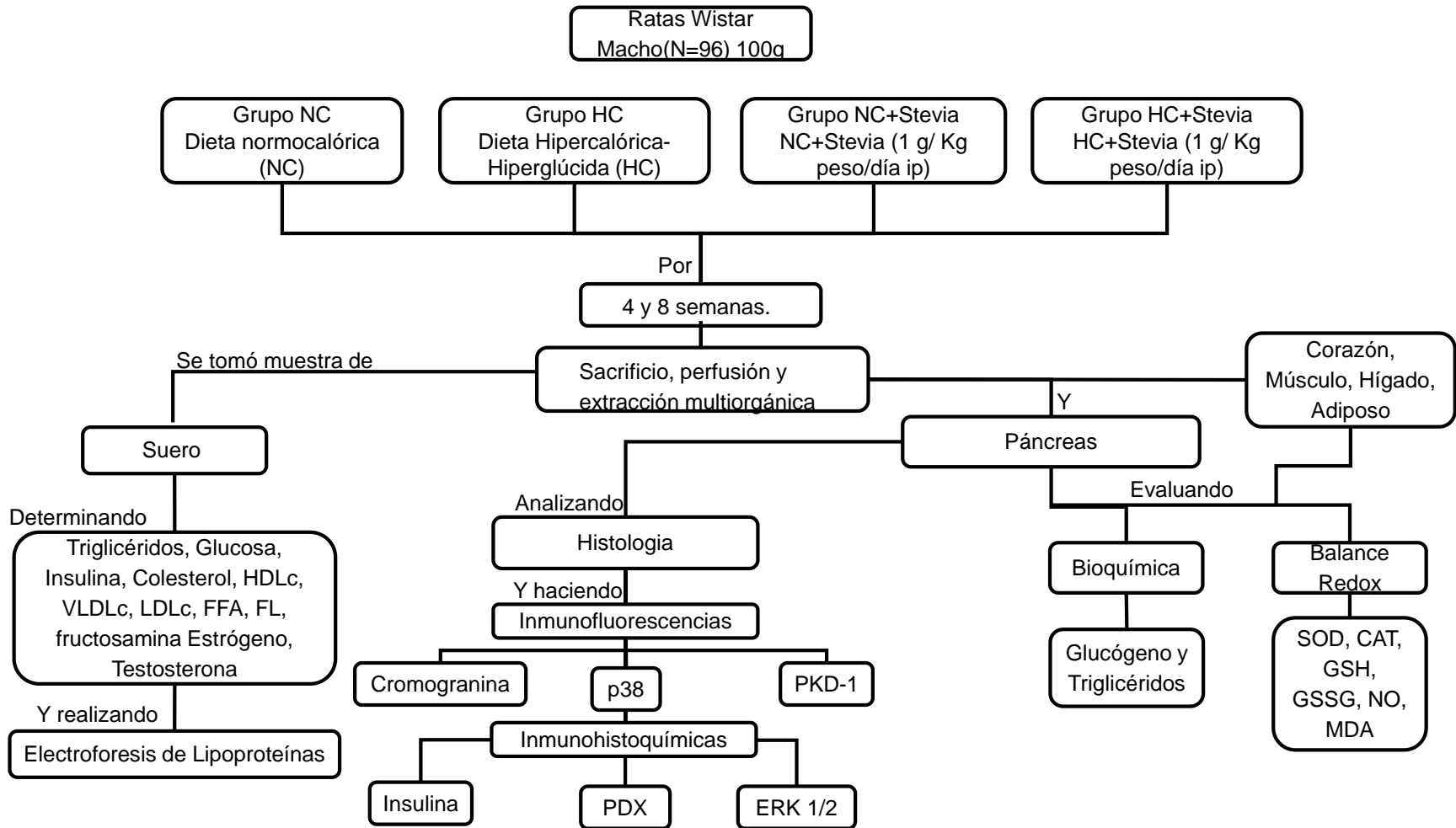
Hipótesis nula

Stevia rebaudiana Bertoni no es un insulíntrópico capaz de modular el metabolismo de glucosa y lípidos en ratas Wistar expuestas a una dieta normo e hipercalórica

Hipótesis alternativa

Stevia rebaudiana Bertoni es un insulíntrópico capaz de modular el metabolismo de glucosa y lípidos en ratas Wistar expuestas a una dieta normo e hipercalórica

7. DIAGRAMA DE TRABAJO



8. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se emplearán 96 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 70 a 80 g. Los animales se pesaron continuamente hasta que alcanzaron los 100 g, aproximadamente 15 días de acondicionamiento.

Tratamientos:

Dieta

Alimentación a un grupo de animales (ratas) de la cepa Wistar con dieta hipercalórica-hiperglúcida, con el siguiente contenido:

COMPOSICION DE LA DIETA HIPERCALORICA HIPERGLUCIDA

Laboratorio de análisis químicos alimentos y aguas BIO-INDU, S.C.

Humedad:	12.01 %
Proteína	7.27 %
Grasa (extracto etéreo)	5.84 %
Cenizas	3.45 %
Fibra cruda	0.00 %
Carbohidratos	71.43 %

Extracto de Stevia

El extracto fue proporcionado por el Dr. José Albino Moreno Rodríguez y el Dr. Efraín Rubio Rosas quienes obtuvieron hojas de SrB de una zona suburbana de Paraguay las cuales fueron autenticados por el personal experto del jardín botánico de la Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Las hojas de SrB se secaron (400 °C), se pulverizaron y maceraron con etanol al 96% (2:50, planta: disolvente). Después de la filtración, el extracto se concentró hasta 650°C a través de un evaporador rotatorio. El concentrado se llevó a una concentración de 20 µM (dil 1:4), de la cual se administraron 200 µL al día por vía intraperitoneal.

Obtención de la muestra sanguínea

Se suspendió el alimento 4 a 5 horas antes de realizar la prueba. Tras anestesiar a las ratas (ketamina+xilazina 0.2 ml/100 g. vía intraperitoneal) se procedió a tomar muestra por punción intracardiaca y se extrajeron 700 μ L de sangre (aproximadamente). La muestra se recolecto en un tubo eppendorf, y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante 10 minutos.

Determinaciones bioquímicas:

Se midieron los parámetros bioquímicos séricos de: glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, colesterol HDL, colesterol VLDL, curva de tolerancia a la glucosa con respuesta de insulina, ácidos grasos libres, fosfolípidos, estrógenos, testosterona y fructosamina; a las 4 y 8 semanas después de haber iniciado la alimentación con la dieta experimental y la administración del extracto de SrB

Una vez obtenidas las muestras, se procedió a la medición:

Métodos

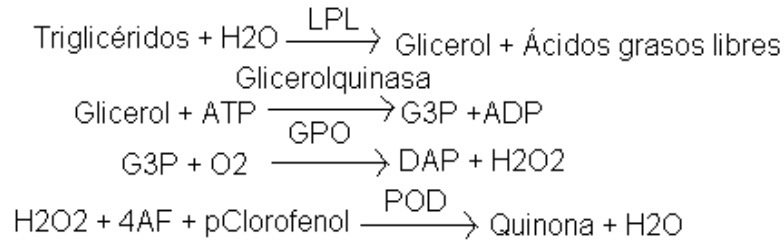
Determinaciones Séricas

Todas las determinaciones colorimétricas se realizaron mediante los kit de reactivos de Spinreact.

- **Determinación de la concentración de triglicéridos.**

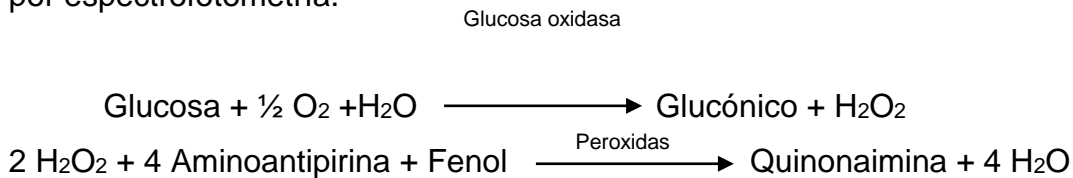
La concentración sérica de triglicéridos, se realizó por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-

aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es medida a una longitud de onda de 505 nm.



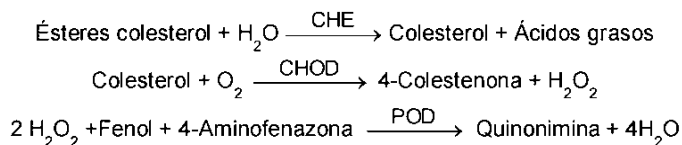
- **Determinación de la concentración de glucosa sérica**

La glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



- **Determinación del Colesterol**

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada

- **Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante**

El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones es hidrolizado por una colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. El detergente presente en el reactivo solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra. El colesterol de HDL se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación. El colesterol esterificado se hidrata mediante una colesterol esteras, dando como resultado colesterol y ácidos grasos

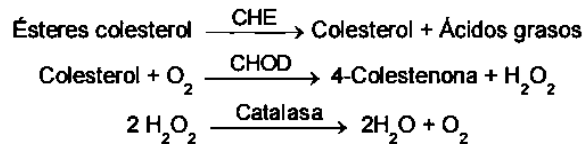
libres, el colesterol resultante sufre una semioxidación e hidratación por una colesterol oxidasa, dando como resultado colesteno y peróxido de hidrógeno, este se acopla a una reacción coordinada por una peroxidasa con 4-aminoantipirina y una solución buffer DSBmT obteniéndose como producto final quinonaimina, que presenta color y este es detectado por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm.

- **Determinación del Colesterol LDL**

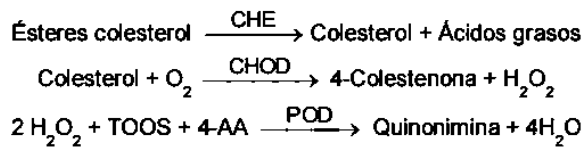
Determinación directa del LDLc (colesterol de lipoproteínas de baja densidad) sin necesidad de pre-tratamiento o centrifugado de la muestra.

La determinación se realiza en dos pasos:

1º Eliminación de lipoproteínas no-LDL



2º Medición de LDLc



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de LDLc presente en la muestra ensayada.

- **Determinación de fructosamina**

Las proteínas glicadas séricas reducen a las sales de tetrazolio (NBT) en medio alcalino. La velocidad de formación del formazán a una temperatura determinada es proporcional a la concentración sérica de proteínas glicadas.

- **Determinación de ácidos grasos libres**

La extracción de los ácidos grasos libres de suero se realiza mediante el empleo de un solvente no polar como el cloroformo, eliminando la interferencia de la bilirrubina por desarrollar el color final con ácido oxálico bis-(cyclohexylidenehydrazide)

("Cuprizone") y midiendo la absorbancia a 620 nm, una parte del espectro dónde la bilirrubina no absorbe. (Soloni F, 1973)

- **Determinación de la concentración de insulina sérica**

En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en el microplato durante la interacción de streptavidin cubierto sobre el pozo y agregando exogenamente anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado. Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo, resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia, para formar un complejo de sándwich soluble. Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidina y el anticuerpo biotinilado. Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando diversas referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

- **Determinación de estrógeno**

El E2 está basado en el principio de adherencia competitiva entre E2 en el espécimen de prueba y el conjugado de E2–HRP para una cantidad constante de anti-estradiol de conejo. En la incubación, los pozos revestidos de IgG anti-conejo de cabra son incubados con 25µl de estándares de E2, controles, y muestras de paciente, 100µL de Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP y 50 µL de reactivo anti-Estradiol de conejo a 37°C por 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fijada de E2 etiquetado de HRP compite con el E2 endógeno en el estándar, muestra, o suero de control. El conjugado de peroxidasa de E2 no adherido es removido y los pozos son lavados. Después, una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de 1N HCl, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color

formada es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con la cantidad de E2 no etiquetado en la muestra. Una curva estándar es obtenida al trazar la concentración del estándar contra la absorbancia. La concentración de E2 de las muestras y controles que corren concurrentemente con los estándares pueden ser calculados con la curva estándar.

- **Determinación de testosterona**

La prueba de testosterona EIA está basada en el principio competitivo entre la testosterona en la muestra y el conjugado de testosterona-HRP por un constante aumento en la cantidad de anti-testosterona de conejo. En la incubación los pozos recubiertos de cabra anti-IgG de conejo son incubados con 10 μ L de estándar de testosterona, controles, muestras del paciente, 100 μ L de testosterona-HRP reactivo conjugado con 50 μ l de reactivo anti-testosterona de conejo y a 37° C por 90 minutos. Durante la incubación un aumento fijado de HRP-etiquetado de testosterona establece una competencia con la testosterona endógena, en él estándar, muestra o control de calidad del suero para fijar un número de sitios unidos en el anticuerpo específico de la testosterona. Esto, así como el aumento del conjugado peroxidasa de Testosterona, inmunológicamente se une en el micro pozo para determinar la concentración presente en las muestras. Las no-uniones del conjugado peroxidasa de testosterona son ahora removidas de los micro pozos por medio de los lavados. Al agregar el reactivo TMB, éste es responsable de dar el color azul en una incubación a temperatura ambiente por 20 minutos. El desarrollo del color es detenido al adicionar la solución de paro (HCl) y la absorbancia es medida a 450 nm. La intensidad del color que se forme es proporcional a la cantidad de enzima presente e inversamente proporcional a la cantidad de testosterona en la muestra. La curva estándar es obtenida al graficar la concentración contra la absorbancia. La concentración de Testosterona de la muestra y al correr los controles con el estándar, puede ser calculada de la curva estándar.

Las determinaciones hormonales se realizaron por técnica de ELISA mediante el kit de reactivos de Diagnóstica Internacional

Determinaciones tisulares

- **Obtención de las biopsias de tejidos.**

Las biopsias de tejidos (hígado, músculo, corazón, riñón, y adiposo) fueron extraídas, finalizada la punción cardiaca y per fundidos con solución salina fría y se almacenaron a -70°C para la posterior determinación de TAG y Glucógeno.

El protocolo para la determinación de TAG fue el utilizado para las determinaciones séricas precedidas de un homogenizado de los tejidos con solución salina isotónica.

- **Determinación de glucógeno**

El método seguido fue el de L. W. Bennett (2007), el cual se basa en la extracción tisular de glucógeno mediante el empleo de ácido perclórico y etanol, seguida de su hidrólisis total mediante fenol y ácido sulfúrico, los cuales producen un compuesto colorimétrico que puede ser leído a 490nm. (L. W. Bennett, 2007)

Determinaciones de estrés oxidativo

- **Actividad de Catalasa**

En el rango ultravioleta H_2O_2 muestra un aumento continuo en la absorción a medida que disminuye la longitud de onda. La descomposición de H_2O_2 puede ser seguida directamente por la disminución en la absorbancia a 240 nm ($\epsilon_{240} = 0,00394 \text{ --- } 0,0002 \text{ litros mmol mm}^{-1}\text{l}$). La diferencia en la absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa.

Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo (normalmente 30 segundos) o la formación de burbujas en la cubeta debido a la liberación de O_2 , es necesario utilizar una concentración de H_2O_2 relativamente baja (10 mM). La concentración de $\text{H} \sim \text{O}_2$ es crítico en la medida en que hay proporcionalidad directa entre la concentración de sustrato y la velocidad de descomposición. Debido a la situación especial en la catalasa la dependencia de la temperatura en la descomposición del H_2O_2 es pequeña ($Q_{10} \sim 1,1$), de modo que las mediciones

pueden llevarse a cabo entre 0 y 37 °; Sin embargo, se recomiendan 20 °. La curva de pH con respecto a la actividad V0 tiene un pH óptimo bastante amplio (pH 6.8 a 7.5): mediciones se realizan a pH 7,0. (Aebi, 1984)

- **Actividad de Superóxido Dismutasa**

El Pirogallol en medio básico se auto-oxida generando en el medio de reacción radicales superóxido, de esta forma la reacción radicalaria se propaga, acelerando la auto-oxidación del Pirogallol cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un secuestrador de radicales superóxidos en el medio, como la SOD inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de auto-oxidación del Pirogallol a 25°C y pH = 8,20.

- **Determinación de Glutación Total y reducido**

El contenido de glutatión en muestras biológicas fue determinado mediante la técnica de reciclaje enzimático basada en el uso de la enzima glutatión reductasa. El glutatión es oxidado por el ácido 5,5'-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por NADPH en presencia de glutatión reductasa. La formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico fue monitoreada a 412 nm y el glutatión presente fue evaluado por comparación del resultado con la curva estándar. El método detectó al glutatión total y GSSG. El procedimiento es específico para GSSG cuando se usa 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina para enmascarar GSH, que no inhiben a glutatión reductasa (Griffith, 1980). Para el cálculo de la concentración de GSH, se realizó la siguiente operación: $GSH = \text{glutatión total} - GSSG$. Para el cálculo del índice redox se utilizó la siguiente operación $Ind\ Redox = GSH + [2 \cdot GSSG] / (2 \cdot GSSG \cdot 100)$. (Griffith, 1980)

- **Cuantificación de Nitritos**

La producción de óxido nítrico fue estimada a través del contenido de ión nitrito (NO₂⁻) en los sobrenadantes de tejido utilizando el método de Griess, el reactivo

de Griess se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-1-naftiletildiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelta en ácido acético al 60%. La reacción colorimétrica fue inducida por la adición de 100 μ L de reactivo de Griess a 100 μ L del sobrenadante del tejido. Se ajustó la reacción a 1 mL con agua destilada. El producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de NO₂ - fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO₂ (0.5 a 10 μ M), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo. (Chao C, 1992)

- **Cuantificación de Malondialdehido**

Los niveles de MDA fueron cuantificados por el método de Esterbauer y Zollner (1989), a 200 μ L del sobrenadante del tejido se le adicionaron 650 μ L de la solución 1 (compuesta de 1-metil-2-fenil-indol a una concentración 10.3 mM en acetonitrilo y metanol) + 150 μ L de ácido metanosulfónico, las muestras se agitaron y se incubaron por una hora a 45° en baño María, después de la incubación se centrifugaron a 3, 500 rpm por 10 min y se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro a 586 nm. La concentración de MDA y 4-HDA fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva estándar patrón de MDA, 1, 1, 3,3-tetrametoxipropano (0.5 a 5 μ M), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo. (Zollner, 1989)

Determinaciones histológicas

- **Tinción de Hematoxilina-Eosina**

Esta técnica utiliza dos colorantes: en primer lugar, los cortes se someten a la acción de la hematoxilina, colorante básico, que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tales como los grupos fosfato del ADN y a las proteínas nucleares que poseen carga negativa. A continuación, los cortes se someten a la acción de la eosina, colorante débilmente ácido, que colorea a las estructuras básicas. Aquellas

estructuras con un pH intermedio se teñirán con ambos colorantes. Esencialmente la hematoxilina tiñe los núcleos de color azul negro, con buen detalle intracelular, mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y la mayoría de las fibras del tejido conectivo con distintas tonalidades de rosa, naranja y rojo

- **Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia**

Las técnicas de Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se fundamentan en la reacción Antígeno - Anticuerpo. Los cortes de tejidos a 3 μm se colocaron en la estufa a 60°C durante 45 minutos y posteriormente fueron desparafinados, deshidratados y rehidratados, se realizó la recuperación antigénica con Diva de Cloaker de Biocare y el bloqueo con albúmina al 2%, posteriormente se inactivó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0.3% y se incubó un primer anticuerpo contra la proteína de interés (Insulina abcam, Cromogranina biocare, P38 δ , PKD-1 y ERK ½ santa cruz, PDX-1 Millipore), el anticuerpo que no interactúa con su antígeno fue removido mediante lavados con PBS y se colocó un segundo anticuerpo afín al primario, el cual tendrá como fin reconocer al primer anticuerpo acoplado a su antígeno, como esta reacción es incolora se utiliza, para la IHC: reacción enzima-sustrato, entre el segundo anticuerpo que se acopla a peroxidasa y su sustrato diaminobencidina, que convierten al cromógeno sin color en un compuesto coloreado que permite identificar el lugar donde se depositaron los anticuerpos reaccionantes, en depósitos anaranjados-cafés; y para la IF: anticuerpos conjugados con un fluoróforo (FICT) que al ser excitados en el microscopio de epifluorescencia nos permiten evidenciar la presencia de los anticuerpos unidos.

9. RESULTADOS

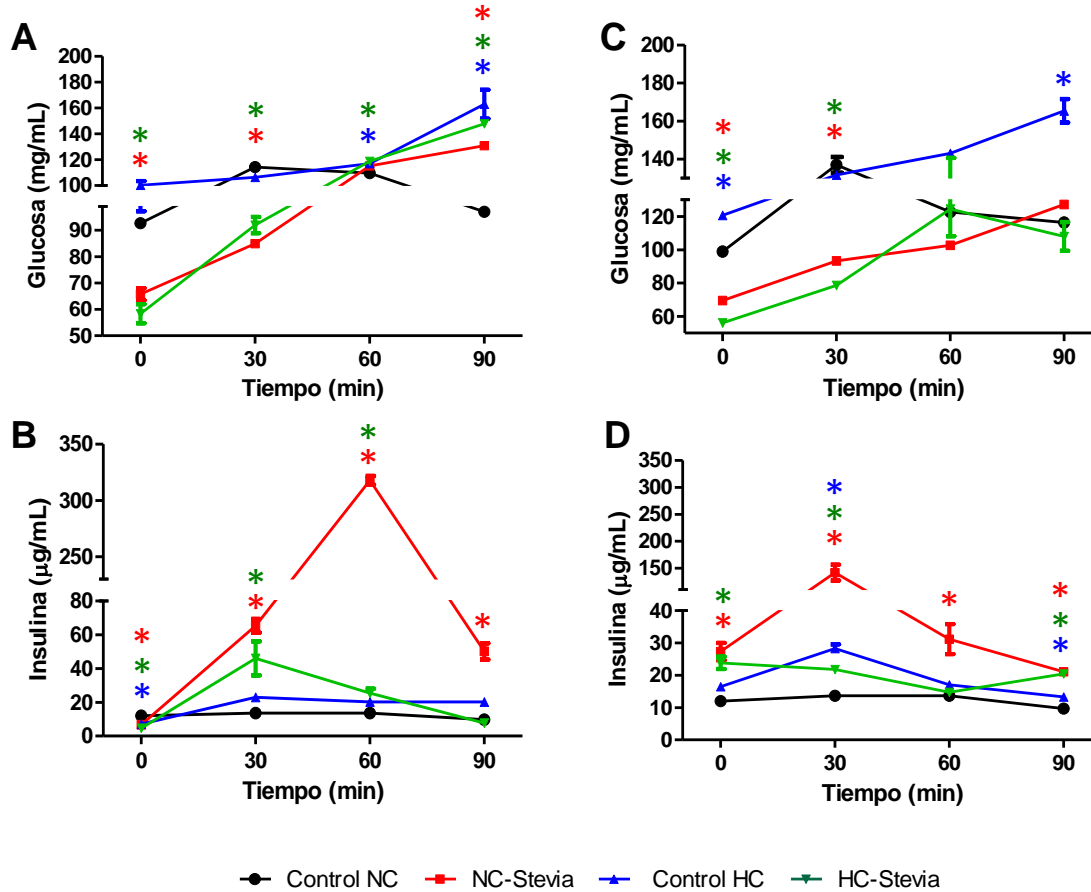


Figura 5. Curvas de Tolerancia a Glucosa y su respuesta de insulina. (A - C) Concentración de glucosa plasmática de 0 – 90 min en respuesta a una TOG de 1.75g/kg, la línea negra representa el grupo control NC, la roja el grupo NC administrado con Stevia, la azul el grupo con dieta hiperglúcida hipercalórica (HC) y la verde el grupo con dieta HC, administrado con Stevia. (D - F) Concentración de insulina plasmática de 0 – 90 min en respuesta a una TOG de 1.75g/kg, la línea negra representa el grupo control NC, la roja el grupo NC administrado con Stevia, la azul el grupo con dieta hiperglúcida hipercalórica (HC) y la verde el grupo con dieta HC, administrado con Stevia. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa respecto al grupo Control NC a $P < 0.05$.

Para evaluar el efecto de Stevia en modelos con si alteración metabólica de carbohidratos y lípidos fueron establecidos los diferentes grupos de trabajo. Los grupos de trabajo fueron seleccionados, administrados y alimentados por 30 y 60

días con dieta NC (grupo control intacto) y por la dieta HC (grupo hipercalórico), en una subdivisión de ambos grupos el extracto de SrB en una dosis (1g/kg/día) fue suministrado vía I.P a los animales correspondientes. En cada tiempo cohorte, se realizaron curvas de tolerancia oral a glucosa (1.75g/Kg), con su respectiva respuesta de insulina a todos los grupos, obteniendo los siguientes resultados; a los 30 días, se observó una disminución significativa en la concentración de glucosa a los 0 y 30 minutos para el grupo NC+Stevia (33.21% y 30.83%) e HC+Stevia (40.73% y 25.11%), al minuto 60 sólo el grupo HC+Stevia incrementó significativamente 9.46% respecto al grupo NC; sin embargo, a los 90 min se observó un incremento de NC+Stevia (30.17%) y HC+Stevia (46.94%). El grupo alimentado con la dieta hipercalórica mostró incremento significativo a los 60 y 90 minutos post-carga de glucosa 11.97% y 58.05%, respectivamente. Por su parte, la respuesta insulínica mostró una disminución en ayuno (tiempo 0 min) en los grupos NC+Stevia (44.61%) e HC+Stevia (60.98%), y un incremento para el grupo (37.84%); se observó un incremento significativo en los grupos NC+Stevia de 379.82% a los 30 minutos y de 1988.04% a los 60, al igual que en el grupo HC+Stevia que presento un aumento de 237.71% a los 30 minutos y 87.08% a los 60, finalmente a los 90 minutos, únicamente se observó un incremento significativo en el grupo NC+Stevia (419.13%). El grupo HC permaneció elevado, pero no significativo durante toda la prueba.

A los 60 días de la administración del extracto de SrB se observó una disminución significativa en la concentración de glucosa a los 0 y 30 minutos en los grupos NC+Stevia (29.79% y 25.36%), e HC+Stevia (43.33% y 37.12% respectivamente), y no existió diferencias el resto de la prueba; contrario a lo observado en grupo HC el cual en ayuno presentó 58.16% más glucosa que el grupo NC, mismo incremento significativo a los 90 minutos. Mientras que la respuesta insulínica, se observó incrementada en los grupos NC+Stevia (128.65%, 0 min; 940.13%, 30 min; 128.90%, 60 min y 117.89%, 90 min), HC+Stevia (71.26%, 0 min; 111.27%, 90 min) e HC que permaneció incrementado durante la prueba (3107.6%, 30 min, 38.54% 90 min).

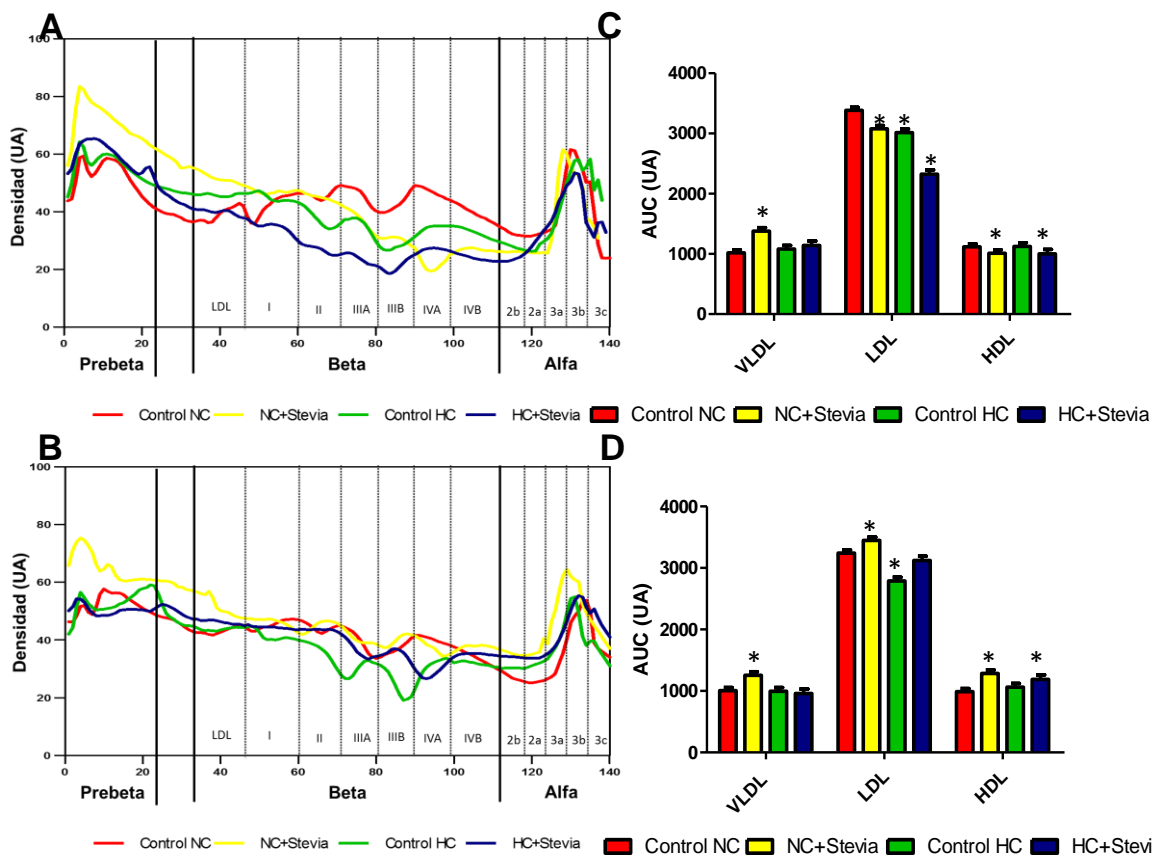


Figura 5. Electroferogramas a los 30 y 60 días de los grupos administrados y no administrados con SrB. (A - B) Análisis densitométrico del corrimiento electroforético de las lipoproteínas plasmáticas en gel de poliacrilamida. el grupo control NC (rojo), grupo NC+SrB (amarillo), grupo HC (verde) y el grupo HC+SrB (azul). (D - F) Análisis del área bajo la curva de cada una de las regiones del corrimiento electroforético, conforme a su lipoproteína correspondiente, grupo control NC (rojo), NC+SrB (amarillo), grupo HC (verde) y el grupo HC+SrB (azul). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

En el modelo experimental se evaluó la distribución lipoproteica de los grupos experimentales. El electroferograma a 30 días muestra que el grupo control presenta regiones pre-beta, beta y alfa características, en base a ello se realizaron comparaciones intergrupales entre regiones características de cada subfracción lipoproteica el grupo NC+Stevia una mayor distribución de VLDL-1 y VLDL-2, así como de LDL-I, pero menor grado de LDL-III A, IIIB, IVA y IV-B, respecto a HDL

existió una mayor distribución en las subfracciones 2a, 2b, 3a y 3b. El grupo HC no mostró diferencias en VLDL, aunque incrementó en LDL-I, pero disminuyó la distribución de LDL-III A, IIIB, IVA y IV-B; respecto a las subfracciones HDL existió menor distribución de 2a, 2b y 3a. El grupo HC+Stevia mostró mayor VLDL-1, pero una menor distribución en LDL-I, IIIA, IIIB, IVA y IV-B. HDL disminuyó en 2a, 2b y 3b. El análisis total del área bajo la curva (AUC) de las regiones completas pre-beta, beta y alfa al mes de tratamiento presentó un incremento en VLDL del grupo NC+Stevia (35.3%), así como una disminución en el área que pertenece a LDL en los grupos NC+Stevia (10%), Control HC (10.9%) y HC+Stevia (31.3%), al igual que en el fragmento correspondiente a HDL en los grupos NC+Stevia (9.3%) y HC+Stevia (10.2%).

La administración al día 60 mostró el grupo NC+Stevia mantuvo una mayor distribución en VLDL-1 y VLDL-2; sin embargo, en las subfracciones LDL no existió diferencia respecto del control. Por su parte las HDL se presentaron incrementadas en cada una de las subfracciones. El grupo HC presenta un desplazamiento hacia la zona de las VLDL-2; una menor presencia de las subfracciones LDL-I, IIIA, IIIB y IVA; en HDL existió una mayor distribución de 2a, 2b y 3a. El grupo HC+Stevia por su parte disminuyó la distribución en VLDL, y particularmente en la subfracción LDL-IVA, de manera inversa en HDL se presentó una mayor distribución en las subfracciones 2a, 2b, 3a, 3b y 3c. En el análisis AUC de VLDL, LDL y HDL se observó un aumento en el grupo NC+Stevia (24.87%, 6.29% y 30.05%), por su parte el grupo HC presentó un decremento de la fracción LDL (13.99%), y finalmente, el grupo HC+Stevia incrementó el área bajo la curva en la región correspondiente a la lipoproteína HDL.

Mesurando	Control NC		NC+Stevia		Control HC		HC+Stevia	
	30	60	30	60	30	60	30	60
Triglicéridos (mg/dL)	95.375±2.21	110.4±3.42	83.27±4.62	112.0±9.99	116.17±13.91▲	120.5±6.86▲	98.23±4.67	177.67±3.72▲
Fosfolípidos (mg/dL)	87.5±8.80	108.40±4.36	109.5±4.43▲	73.93±2.92▼	118.67±3.39▲	56.89±1.43▼	130.67±5.28▲	108.0±3.21
Ácidos grasos libres (mg/dL)	2.95±0.28	2.83±0.17	2.43±0.19	2.49±0.18	2.55±0.04	1.82±0.12▼	3.76±0.13▲	2.96±0.11
Colesterol Total (mg/dL)	156.58±5.59	128.4±2.19	142.2±7.85	126.67±1.98	98.93±5.80▼	150.25±4.11▲	157.11±2.17	139.17±2.64▲
Colesterol HDL (md/dL)	65.00±2.26	66.8±1.34	69.80±3.93	47.68±3.12▼	57.38±3.89	48.05±2.51▼	69.57±2.44	50.052±3.63▼
Colesterol LDL (mg/dL)	72.5±4.12	45.80±1.92	55.75±5.25▼	56.58±2.13	18.32±0.38▼	76.75±6.07▲	67.9±2.07	67.21±4.38▲
Colesterol VLDL (mg/dL)	19.08±0.44	15.80±0.72	16.65±0.92	22.40±2.0▲	23.23±2.78	25.45±0.96▲	19.65±0.93	21.53±0.74▲
Fructosamina mmol/L	198.96±4.4	131.89±5.3	216.32±16.55	250.25±14.63▲	207.27±10.03	216.15±5.47▲	247.47±23.0	207.87±20.04▲

Tabla 1. Efecto de SrB sobre lípidos séricos. Los datos presentados son la media de los valores medidos ± el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bon-Ferroni. (*) Indica diferencia significativa a P<0.05.

Efecto del extracto de SrB sobre el metabolismo de lípidos

Al observar los efectos en el comportamiento sérico de glucosa e insulina, y debido a la influencia que estos ejercen sobre el metabolismo lipídico, se determinaron los niveles séricos de TAG, FL, AGL, CT y sus densidades (VLDL, LDL y HDL) y de manera complementaria a la dinámica manejo de carbohidratos la glicación de proteínas por fructosamina a los tiempos de 30 y 60 días en los diferentes grupos de trabajo, los resultados están en función del grupo control NC. Al corte de 30 días, el grupo NC+Stevia no presentó diferencias en TAG, AGL, CT, HDL y VLDL; incrementó la concentración de FL del 25.14% y disminuyó la de LDL en 23.10% ambos de manera significativa. El grupo HC no mostró diferencias en TAG, AGL y VLDL, incrementos significativos en FL (35.54%) y disminuciones en CT, HDL y LDL de 38.09%, 28.06% y 74.73% respectivamente. Por su parte el grupo HC+Stevia únicamente mostró incrementos significativos en FL y AGL, los cuales correspondieron a 49.25% y 27.45%, los mesurandos restantes no exhibieron diferencias respecto del grupo control.

A los 60 días de tratamientos el grupo NC+Stevia mostró incrementos en LDL (23.1%), VLDL (41.77%), y fructosamina (89.74%), disminuciones significativas presentaron los FL (31.8%) y las HDL (28.62%). El grupo HC incrementó en CT, LDL, VLDL, y fructosamina, que correspondieron a 17.01%, 67.57%, 61.07% y 63.88% respectivamente; de manera contraria y significativa se observaron los FL (47.5%), AGL (35.7%) y HDL (28.1%). Finalmente, el grupo HC+Stevia incrementó significativamente en CT, LDL, VLDL y fructosamina, 8.4%, 46.7%, 36.3% y 57.60% respectivamente; mientras que las HDL se hallaron disminuidas significativamente 25.1%.

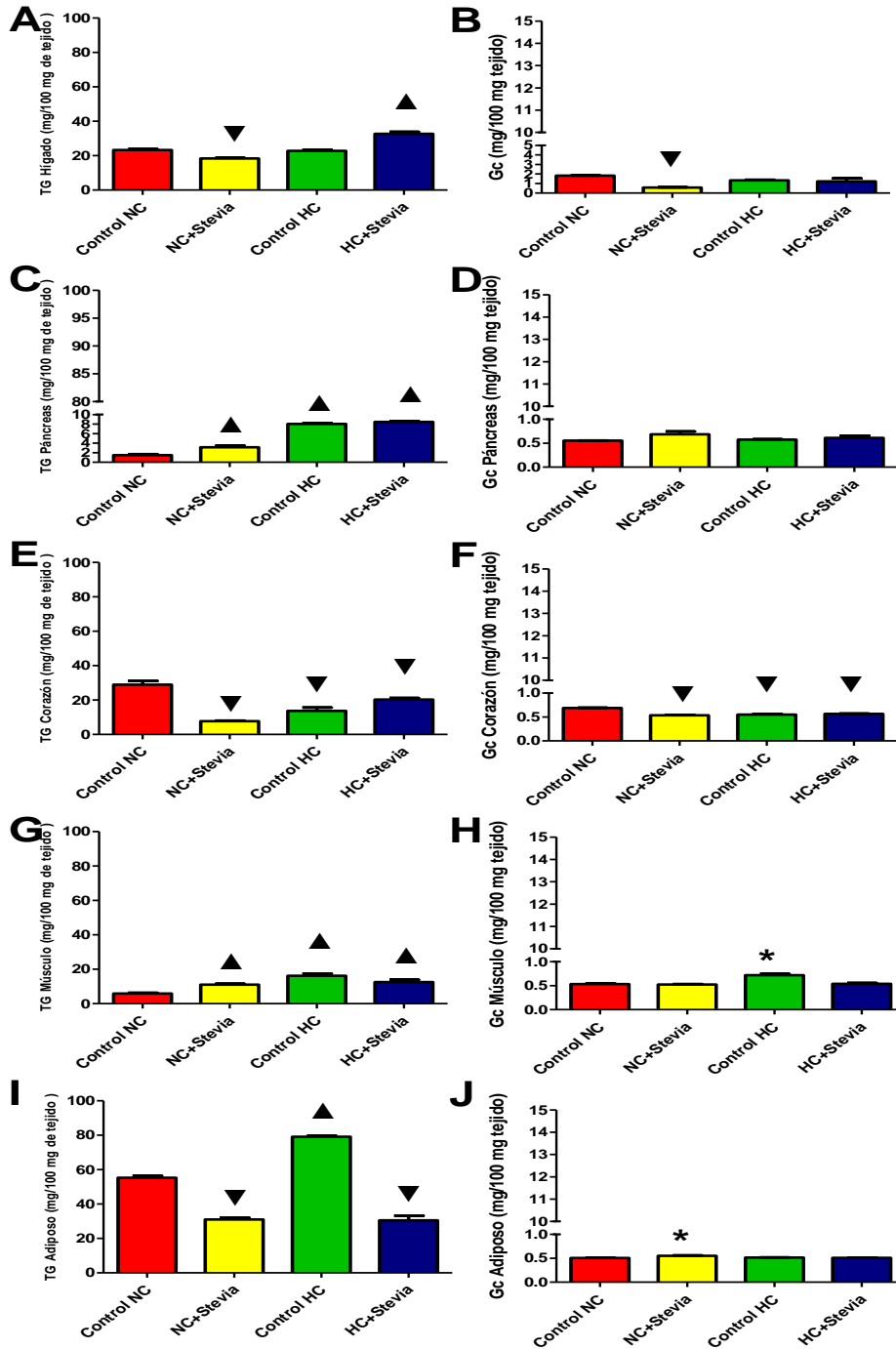


Figura 6. Efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB en el resguardo de lípidos y glucosa en diversos tejidos. Determinación de triglicéridos (izquierda) y glucógeno (derecha) para hígado (A-B), páncreas (C-D), corazón (E-F), músculo (G-H) y tejido adiposo (I-J); grupo Control NC (Rojo), NC+Stevia (amarillo), HC (verde), y HC+Stevia (azul). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Stevia como reguladora de la distribución del resguardo energético tisular

Con la finalidad de conocer la manera en se distribuyen los carbohidratos y lípidos hacia los diferentes tejidos, por la acción de Stevia y su combinación con una dieta alta calórica fueron cuantificados triglicéridos y glucógeno en hígado, músculo, corazón, páncreas y tejido adiposo. Tras 30 días de administración del extracto de SrB, se observó que en hígado del grupo NC+Stevia, disminuyó los niveles de triglicéridos y glucógeno en 21.2% y 67.6%, respectivamente. El grupo HC no mostró diferencias respecto del control NC. El grupo HC+Stevia incrementó su concentración en un 40.81%. En tejido pancreático, los triglicéridos incrementaron en NC+Stevia (111.1%), Control HC (442.3%) y HC+Stevia (467.8%), mientras que los niveles de glucógeno se mantuvieron sin diferencias significativas respecto al grupo Control NC.

Por su parte, en corazón, los niveles de triglicéridos y glucógeno mostraron un decremento en los grupos NC+Stevia (73.5% y 22.1%), Control HC (52.6% y 19.8%) y HC+Stevia (29.7% y 17.8%). Muscularmente, la acumulación de triglicéridos se vio aumentada en los grupos NC+Stevia (88.3%), Control HC (177.0%) y HC+Stevia (114.8%), mientras que el glucógeno únicamente se incrementó en el grupo HC en 34.8%. Finalmente, se observó una disminución de triglicéridos en el tejido adiposo en los grupos NC+Stevia (43.9%) y HC+Stevia (44.8%), y un incremento en el grupo Control HC (43.0%), además de un aumento en los niveles de glucógeno en el grupo NC+Stevia (8.5%).

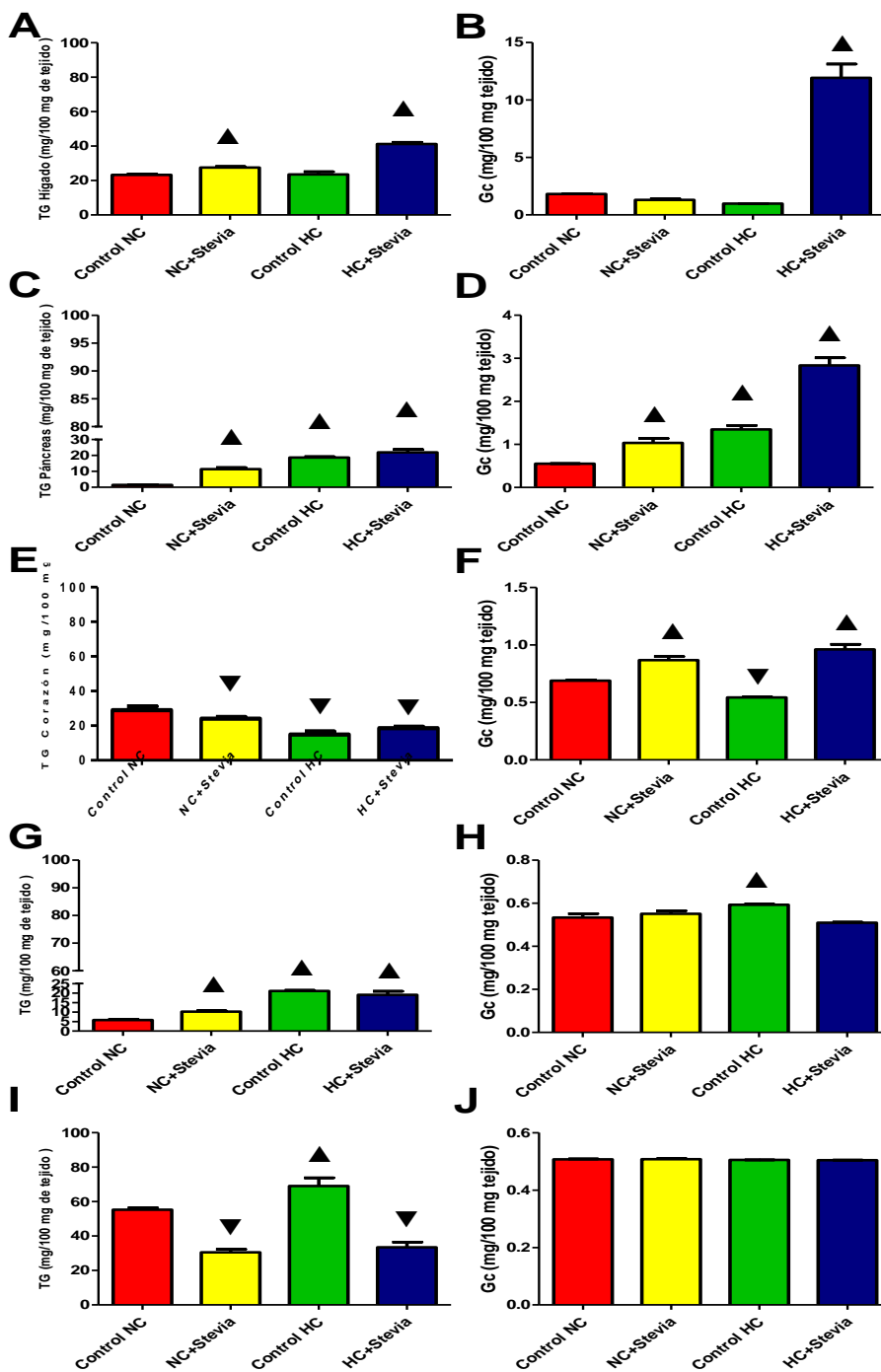


Figura 7. Efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB en el resguardo de lípidos y glucosa en diversos tejidos. Determinación de triglicéridos (izquierda) y glucógeno (derecha) para hígado (A-B), páncreas (C-D), corazón (E-F), músculo (G-H) y tejido adiposo (I-J); grupo Control NC (Rojo), NC+Stevia (amarillo), HC (verde), y HC+Stevia (azul). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Luego de 60 días de administración del extracto de SrB, se mantiene en el hígado, un incremento de triglicéridos en el grupo NC+Stevia (18.5%) del mismo modo para el grupo HC+Stevia (77.1%) y glucógeno (558.6%) respecto al grupo control NC. Para el caso de páncreas tanto los niveles de triglicéridos como de glucógeno, mostraron un mayor resguardo respecto al grupo control NC en los grupos NC+Stevia (665.8% y 87.1%), Control HC (1151.7% y 144.4%) e HC+Stevia (1371.1% y 413.4%). El corazón por el contrario mostró una disminución en los niveles de triglicéridos en el grupo NC+Stevia (22.8%), Control HC (52.2%) y HC+Stevia (40.4%) y un incremento en los niveles de glucógeno de 25.87%, 17.96% y 39.40% para los grupos NC+Stevia, Control HC e HC+Stevia respectivamente. En músculo, se presentó un incremento en los niveles de triglicéridos en los grupos NC+Stevia, Control HC y HC+Stevia (74.87%, 262.90% y 226.83%, respectivamente), en éste último grupo aumentaron también los niveles de glucógeno (11.29%); por último, el tejido adiposo, disminuyó su resguardo de triglicéridos en los grupos NC+Stevia (44.75%) e HC+Stevia (39.58%) incrementándolo en el grupo Control HC (24.81%), y manteniendo sin cambios significativos los niveles de glucógeno.

Efecto antioxidante de Stevia rebaudiana Bertoni

Tabla 2. Actividad de Catalasa y Superóxido Dismutasa

Tiempo	CAT (UA/mg proteína)				SOD (UA/mg proteína)			
	NC	NC+S	HC	HC+S	NC	NC+S	HC	HC+S
Hígado								
30 días	1.79±0.20	1.90±0.14	3.59±0.60▲	1.99±0.41	3.57±0.24	2.25±0.05	11.40±1.72▲	3.16±0.74
60 días	1.82±0.16	1.58±0.19	2.53±0.77▲	2.40±0.52	3.42±0.31	8.63±0.89▲	3.64±0.16	28.13±1.47▲
Páncreas								
30 días	1.42±0.15	2.39±0.10▲	5.54±0.37▲	2.72±0.40▲	14.71±2.5	15.9±1.19	1.59±0.46▼	17.99±1.76
60 días	1.35±0.21	1.75±0.48	5.16±0.63▲	5.18±0.50▲	14.83±1.3	5.63±0.51▼	1.66±0.37▼	13.016±1.17
Corazón								
30 días	2.31±0.74	2.75±0.26	5.10±0.17▲	3.66±0.87▲	12.97±1.55	32.84±3.5▲	1.12±0.22▼	20.24±2.75▲
60 días	2.42±0.29	2.07±0.67	3.14±0.15▲	2.82±0.29	13.05±1.02	12.53±1.53	1.57±0.17▼	10.83±1.97
Músculo								
30 días	0.56±0.03	0.33±0.08▼	1.40±0.17▲	0.132±0.02*	0.74±0.07	2.50±0.24▲	6.89±0.42▲	1.65±0.16▲
60 días	0.47±0.05	0.17±0.03▼	0.50±0.08	0.302±0.06*	0.63±0.05	2.79±0.19▲	6.15±0.62▲	1.30±0.14▲
Adiposo								
30 días	0.71±0.09	10.43±1.49▲	13.6±3.04▲	3.27±0.84▲	5.05±0.46	20.82±2.19▲	15.23±0.34▲	16.55±2.91▲
60 días	0.79±0.03	11.08±2.16▲	6.32±0.82▲	1.49±0.41	5.48±0.29	4.95±0.43	1.02±0.28▼	2.83±0.33▼

Los datos presentados son la media de los valores medidos ± el EEM (Error Estándar de la Media).

Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni.

(*) Indica diferencia significativa respecto al control NC a P<0.05.

Tabla 3. Concentración glutatión reducido, oxidado e índice redox.

Tiempo	GSH TOTAL ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)				GSSG ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)				GSSG/GSH			
	NC	NC+S	HC	HC+S	NC	NC+S	HC	HC+S	NC	NC+S	HC	HC+S
Hígado												
30 días	0.249±0.01	0.636±0.06▲	0.950±0.09▲	0.258±0.05	0.052±0.004	0.151±0.01▲	0.002±0.001	0.088±0.01	0.263±0.04	0.311±0.02▲	0.002±0.002▼	0.518±0.12▲
60 días	0.290±0.03	0.831±0.01▲	0.772±0.1▲	2.791±0.42▲	0.04±0.003	0.013±0.001▼	0.004±0.001▼	0.014±0.077▼	0.160±0.07	0.016±0.006▼	0.006±0.001▼	0.005±0.0004▼
Páncreas												
30 días	0.282±0.01	0.181±0.01▼	0.018±0.002▼	0.408±0.02▲	0.043±0.003	0.138±0.01▲	0.002±0.001▼	0.207±0.01▲	0.156±0.015	3.232±0.64▲	0.094±0.003▼	1.024±0.24▲
60 días	0.330±0.09	0.345±0.05	0.022±0.005▼	0.872±0.02▲	0.060±0.005	0.004±0.0006▼	0.001±0.0002▼	0.007±0.002▼	0.222±0.04	0.013±0.003▼	0.032±0.001▼	0.009±0.004▼
Corazón												
30 días	0.374±0.02	1.566±0.11▲	0.020±0.001▼	0.427±0.05▲	0.038±0.004	0.339±0.03▲	0.001±0.0004	0.160±0.01▲	0.129±0.013	0.276±0.03▲	0.068±0.01▼	0.599±0.03▲
60 días	0.210±0.06	2.263±0.57▲	0.689±0.02▲	0.661±0.07▲	0.050±0.002	0.022±0.006▼	0.002±0.0001▼	0.006±0.001▼	0.313±0.018	0.010±0.005▼	0.002±0.005▼	0.008±0.001▼
Músculo												
30 días	0.060±0.003	0.260±0.04▲	0.474±0.01▲	0.060±0.001	0.006±0.0001	0.056±0.002▲	0.004±0.0006	0.026±0.003▲	0.111±0.002	0.275±0.03▲	0.008±0.003▼	0.765±0.02▲
60 días	0.050±0.001	0.370±0.02▲	1.280±0.2▲	0.111±0.001▲	0.008±0.003	0.003±0.001	0.016±0.002▲	0.001±0.0002▼	0.190±0.01	0.008±0.001▼	0.013±0.002▼	0.009±0.001▼
Adiposo												
30 días	0.140±0.02	0.190±0.01▲	0.289±0.01▲	0.210±0.02▲	0.013±0.002	0.046±0.002▲	0.011±0.003	0.069±0.003▲	0.102±0.001	0.319±0.3▲	0.039±0.001▼	0.489±0.02▲
60 días	0.100±0.01	0.170±0.01▲	0.127±0.07▲	0.432±0.03▲	0.020±0.01	0.001±0.0002▼	0.004±0.0009▼	0.002±0.001▼	0.250±0.02	0.006±0.001▼	0.035±0.001▼	0.005±0.001▼

Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa respecto al control NC a $P < 0.05$.

Tabla 4. Concentración de malondialdehído y nitritos en diferentes tejidos.

	MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)				NITRITOS ($\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)			
Hígado								
	NC	NC+S	HC	HC+S	NC	NC+S	HC	HC+S
30 días	1.23 \pm 0.11	0.90 \pm 0.06	0.13 \pm 0.01 ▼	1.66 \pm 0.22	0.10 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.21 \pm 0.049 ▲	0.35 \pm 0.06 ▲
60 días	1.20 \pm 0.15	0.58 \pm 0.16 ▼	0.11 \pm 0.02 ▼	1.25 \pm 0.19	0.13 \pm 0.03	0.34 \pm 0.02 ▲	0.19 \pm 0.04	0.86 \pm 0.09 ▲
Páncreas								
30 días	0.82 \pm 0.09	2.07 \pm 0.24 ▲	0.07 \pm 0.01 ▼	4.73 \pm 0.38*	0.10 \pm 0.012	0.60 \pm 0.07 ▲	0.08 \pm 0.01	0.50 \pm 0.06 ▲
60 días	0.87 \pm 0.04	2.43 \pm 0.07 ▲	0.21 \pm 0.02 ▼	1.55 \pm 0.18*	0.09 \pm 0.01	0.56 \pm 0.06 ▲	0.14 \pm 0.07	0.79 \pm 0.02 ▲
Corazón								
30 días	2.10 \pm 0.24	3.05 \pm 0.41 ▲	0.11 \pm 0.002 ▼	2.36 \pm 0.20	0.35 \pm 0.07	0.25 \pm 0.02	0.02 \pm 0.009 ▼	0.17 \pm 0.06
60 días	2.09 \pm 0.18	1.48 \pm 0.32	0.19 \pm 0.05 ▼	0.73 \pm 1.75 ▼	0.32 \pm 0.05	0.37 \pm 0.04	0.06 \pm 0.02 ▼	0.35 \pm 0.01
Músculo								
30 días	0.23 \pm 0.04	0.37 \pm 0.09	1.01 \pm 0.38 ▲	0.37 \pm 0.06	0.05 \pm 0.009	0.03 \pm 0.005	0.10 \pm 0.01 ▲	0.06 \pm 0.001
60 días	0.25 \pm 0.02	0.32 \pm 0.09	0.61 \pm 0.12 ▲	0.23 \pm 0.02	0.04 \pm 0.006	0.33 \pm 0.09 ▲	0.09 \pm 0.006	0.04 \pm 0.002
Adiposo								
30 días	1.45 \pm 0.01	1.97 \pm 0.29	0.20 \pm 0.04 ▼	1.26 \pm 0.18	0.16 \pm 0.003	0.72 \pm 0.01 ▲	0.16 \pm 0.03	0.35 \pm 0.07 ▲
60 días	1.46 \pm 0.03	1.31 \pm 0.28	0.77 \pm 0.12 ▼	1.61 \pm 0.30	0.13 \pm 0.002	0.58 \pm 0.05 ▲	0.07 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04 ▲

Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa respecto al control NC a $P < 0.05$.

Un aspecto relevante descrito para Stevia es la actividad antioxidante en la cual basa su mecanismo de acción sobre el control metabólico, debido a esto fue importante evaluar tanto la capacidad antioxidante, como la producción de especies pro-oxidantes en nuestro modelo de estudio. Encontrando después de la evaluación a 30 días con los diferentes tratamientos, que en el hígado del grupo NC+Stevia se presentó un incremento de GSH (155.2%), GSSG (190.1%), sin cambios en el índice redox, la actividad de CAT y SOD, además de las moléculas oxidativas. El músculo la actividad de CAT no mostró diferencias, sin embargo, SOD incrementó su actividad 237.8%, así mismo GSH, GSSG y GSSG/GSH incrementaron 333.3%, 833.3% y 147%, respectivamente; sin cambios en las marcas de estrés oxidativo. Corazón por su parte incrementó la actividad de SOD (153.2%), en los niveles de GSH (318.9%), GSSG (692%), en el radio GSSG/GSH (113.6%) y la concentración de MDA (45.2%). En páncreas, incrementó la actividad de CAT (68.3%), pero no de SOD, mientras que los niveles de GSH disminuyeron 35.7%, contrario a lo observado para GSSG el cual incrementó 263.5%, en el mismo sentido el GSSG/GSH incrementó en 1968.3%, así como las concentraciones de MDA y NO (152.4% y 500%, respectivamente).

Finalmente, en tejido adiposo incrementó la actividad de CAT y SOD (1369% y 312.3%), así como la concentración de GSH (35.7%), GSSG (253.8%) y por ende del índice redox (212%), en relación a los marcadores de estrés oxidativo, sólo el NO incrementó en un 350%.

Por su parte, en el hígado del grupo Control HC la actividad de CAT y SOD incrementaron en 100.6% y 219.3%, mientras que los niveles de GSH en el mismo sentido incrementaron 281%, disminuyendo los niveles de GSSG y del ratio redox en 96.3% y 99.2%, así como la concentración de MDA (89.4%), aunque la producción de NO incrementó en un 110%. Músculo, incrementó también su actividad enzimática 150% (CAT) y 831.1% (SOD); GSH también incrementó 690.2%, aunque GSSG mostró cambios por lo que el índice redox disminuyó 93.1%, aunque los indicadores de estrés oxidativo MDA y NO aumentaron significativamente en 339.13% y 100%, respectivamente. Corazón presentó el siguiente comportamiento incremento en la actividad de CAT (120.8%) y disminución de SOD 91.4%, disminución significativa en GSH (94.6%), GSSG (97%) y una mayor concentración de MDA (94.8%), aunque disminuyó el NO (94.3%). Páncreas, también incrementó la actividad de CAT (94.28%), aunque disminuyó SOD un 89.2%, mientras los niveles de GSH cayeron 93.7%, del mismo modo GSSG (96%), ocasionando el mismo comportamiento en GSSG/GSH (39.5%); sorpresivamente MDA también disminuyó 91.5%, aunque NO se mantuvo sin cambios. Finalmente, adiposo incrementó de manera importante la actividad de CAT y SOD (1815.5% y 201.6%), mientras que el GSH incrementó en 106.1%, por lo que el ratio GSSG/GSH disminuyó en 61.9%, mismo caso para MDA (86.2%) y de manera contraria para NO incrementando en 118.8%.

Por su lado, en el grupo HC+Stevia no observó cambios de la actividad enzimática hepática, y en los niveles totales de GSH y GSSH, aunque no así en la ratio GSSG/GSH el cual incrementó en 96.6%, mismo caso en el NO (250%). Músculo, disminuyó en CAT (76.4%), pero incrementó en SOD (123%) y GSSH (333.3%), por lo que la relación GSSG/GSH incrementó 588.2%. Corazón mostró incremento en la actividad de CAT (58.4%), SOD (56%), en la concentración de GSSG (273.3%) y en el índice redox (363%). Páncreas incrementó la actividad enzimática de CAT (91.6%), el nivel de GSH (45.1%) y GSSG (443.3%), así como de su índice redox (555.7%),

concentración de MDA (476.8%) y NO (400%). Tejido adiposo también incrementó la actividad de CAT y SOD en 360.6% y 227.7%, así como la concentración de GSH (50%), GSSG (430.8%) y la relación GSSG/GSH (378.1%).

Luego de una administración por 60 días el grupo NC+Stevia en hígado SOD incrementó 152.3%, los niveles de GSH aumentaron en un 186.4%, aunque disminuyó GSSG un 68% y el radio GSSG/GSH (90.2%), así mismo MDA disminuyó 51.7%, y contrariamente el NO incrementó 161.5%. Para músculo la actividad en CAT disminuyó 63.8% e incrementó para SOD (342.9%), el nivel de GSH aumentó en 640% y la forma oxidada se redujo 62.5%, por lo que el índice redox en el mismo sentido se redujo 95.7%, contrario a lo observado en NO, el cual incrementó un 725%. Respecto a corazón el nivel de GSH aumentó 977.5%, mientras que disminuyeron GSSG un 55.1% y el índice redox 96.8%, mientras las moléculas de estrés se mantuvieron sin cambios. Páncreas de NC+Stevia al día 60 mantuvo a CAT elevada 29.6% y SOD (29.6%), mientras que el GSSG disminuye 92.6%, lo mismo que el índice redox (94.1%), conllevando al incremento de MDA (179.3%) y NO (522%). Tejido adiposo por su parte mostró incrementada la actividad de CAT (1302.5%), pero sin cambios en SOD; incremento en el nivel de GSH (70%) fue observado, con disminuciones en GSSH (95%) y GSSG/GSH (97.6%); únicamente la concentración de NO incrementó 346.2% por parte de los indicadores de estrés.

En cuanto al grupo HC, se pudo observar que el hígado incrementó la actividad de CAT (39%), pero no de SOD; Los niveles de GSH se estimularon positivamente un 166.2%, mientras que GSSG y el índice redox disminuyeron en un 88.9% y 97.4%, respectivamente. Los niveles de MDA también mostraron reducción del 90.83%. En músculo la actividad enzimática de CAT decayó un 35.7%, mientras que SOD incrementó en 876.2%. GSH fue incrementado en 2460%, mismo caso para GSSG 98.1%, sin embargo, debido a la diferencia tan marcada el índice GSSG/GSH disminuyó en 93.4%. Los niveles de MDA incrementaron en un 144%, aunque NO no mostró cambios. Por su parte el corazón, mostró actividad incrementada de CAT (27.1%) y disminuida en SOD (88%); incremento en la concentración de GSH (228.1%) fue observada, mientras que GSSG, el índice redox, MDA y NO se redujeron en 96.6%, 99.2%, 90.9% y 81.3%, respectivamente. Páncreas mostró mayor actividad de CAT

(282.2%), pero disminución en SOD (88.8%); Disminución en los niveles de GSH, GSSG y su relación, fueron observadas (93.3%, 98.9% y 85.7%), así como también para MDA (75.9%). Tejido adiposo incrementó la actividad de CAT (700%), aunque disminuyó la de SOD (81.4%); La respuesta de GSH se vio incrementada (26.5%), aunque la fracción oxidada y su relación disminuyeron (78.6% y 85.9%). Los indicadores oxidativos MDA y NO permanecieron sin cambios.

Finalmente; para el caso del grupo HC+Stevia, la actividad enzimática únicamente incrementó en SOD (722.5%), aunque también la concentración de GSH (862.4%), a expensas de una disminución en el GSSG (63.9%), y el índice GSSH/GSH, (97.8%). En relación a los biomarcadores de estrés, NO incrementó en 561.5%. Músculo observó mayor actividad de SOD (106.3%), así como de GSH (122%), con disminución de GSSG y su relación (87.5% y 95.2%). Corazón a su vez no evidenció diferencias en cuanto a la actividad enzimática, pero incremento los niveles de GSH (214.6%), aunque disminuyó GSSG (89%) y GSSH/GSH (97.3%); MDA también disminuyó en corazón (65.1%). Páncreas, mostró incremento de CAT (283.7%), aunque SOD se mantuvo sin cambios. GSH incrementó en 164.4%, pero disminuyó el GSSG en 87.7%, radio GSSH/GSH en 96.1%; sin embargo, se observó incremento en la lipoperoxidación dada por MDA (78.2%), así como en los niveles de NO (777.1%). El tejido adiposo observó una baja actividad de SOD (48.4%) con incremento en la concentración total de GSH (332%), a expensas de una disminución en el GSSG (90%), GSSH/GSH (98.1%), sin embargo, la concentración de NO incrementó en 153.8%.

Influencia de SrB en la histología pancreática

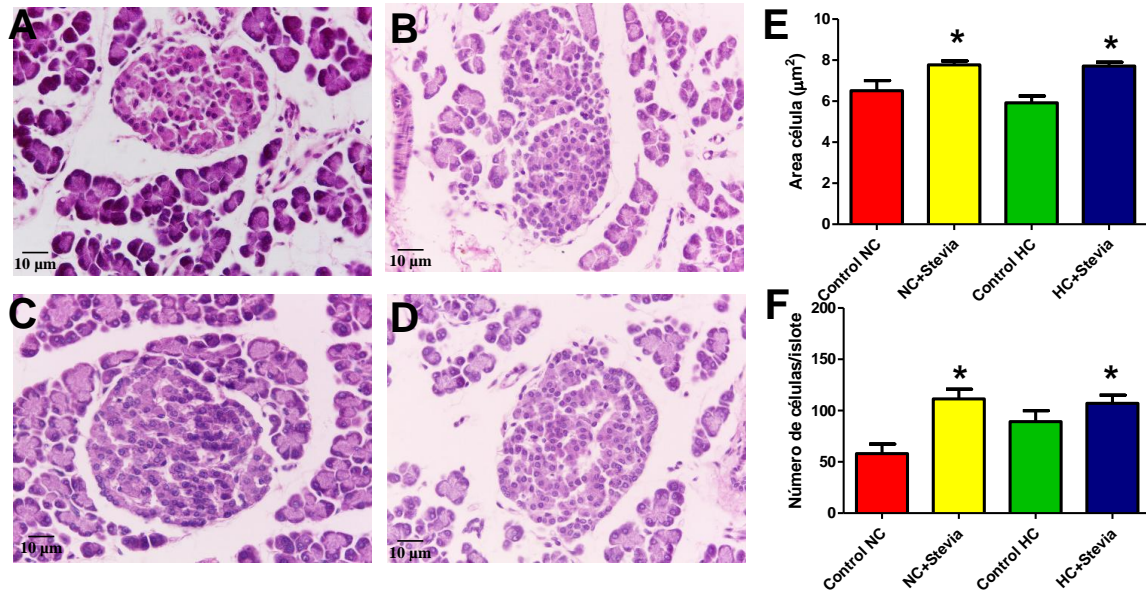


Figura 8. Efecto de los diferentes tratamientos por 30 días sobre la histología de los islotes de Langerhans. (A-B) Se muestran fotomicrografías representativas del grupo control NC y NC+SrB. **(C-D)** Fotomicrografías representativas del grupo HC y HC+SrB. **(E)** Cuantificación de área de célula (μ^2). **(F)** Número de células por islote. Las fotomicrografías fueron tomadas y analizadas con objetivo 40X. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa respecto al grupo Control NC a $P < 0.05$.

Posterior al análisis de los resultados previos, se observó que el tejido pancreático es probablemente uno de los más afectados por la administración del extracto de SrB, por lo que se procedió a la evaluación histológica, para determinar el estado del tejido, así como las respuestas de hipertrofia e hiperplasia por medio de la tinción de hematoxilina-eosina, para lo cual se tomaron fotografías del tejido de interés por cada uno de los animales de los diferentes grupos. Posteriormente se realizó el conteo de células por islote y la medición del área promedio por célula.

Al realizar el análisis se encontró que a los 30 días de administración del extracto de SrB, se observa un incremento en el tamaño de célula en el grupo NC+Stevia (18.8%), así como un mayor número de células (92%); De manera interesante a este tiempo, el grupo Control HC no presentó diferencias significativas respecto al grupo Control NC; mientras que en el grupo HC+Stevia observó un incremento en el tamaño promedio

de célula (18.4%), además de un incremento significativo en el número de células por islote (84.6%).

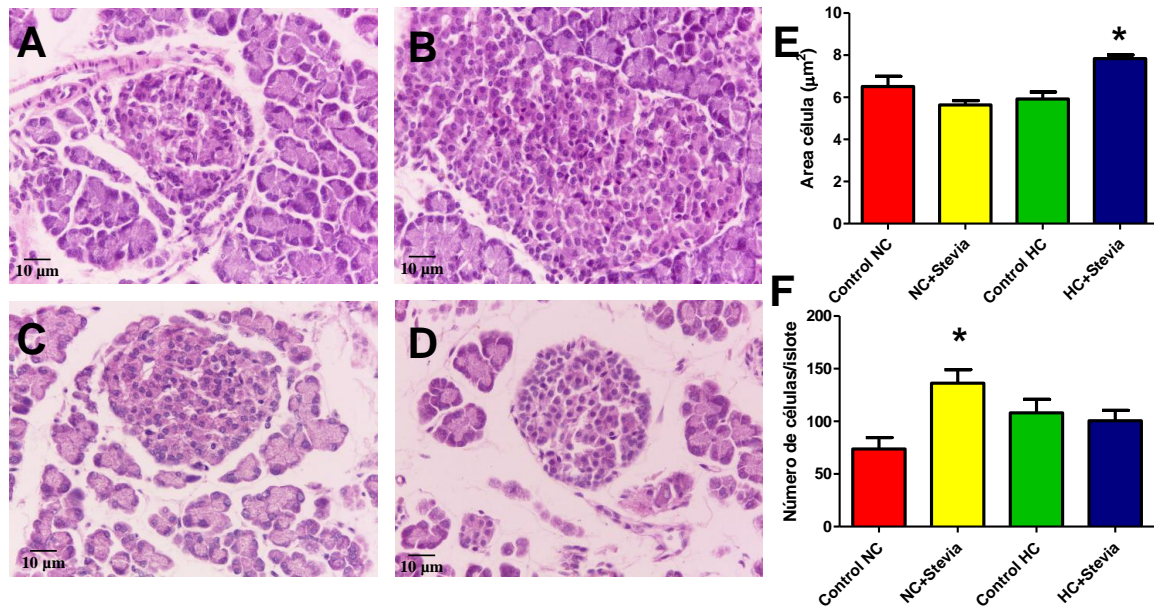


Figura 9. Efecto de los diferentes tratamientos por 60 días sobre la histología de los islotes de Langerhans. (A-B) Se muestran fotomicrografías representativas del grupo control NC y NC+SrB. **(C-D)** Fotomicrografías representativas del grupo HC y HC+SrB. **(E)** Cuantificación de área de célula (μ^2). **(F)** Número de células por islote. Las fotomicrografías fueron tomadas y analizadas con objetivo 40X. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa respecto al grupo Control NC a $P < 0.05$.

Luego de 60 días de administración del extracto, la citoarquitectura pancreática aparece conservada y con rasgos de tamaño, distribución y forma normales, no obstante, el grupo NC+Stevia mantiene un incremento en el número de células por islote (84.7%). El grupo control HC se mantuvo sin diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control NC, sin embargo, ya existe una tendencia a incrementar el número de células por islote. Mientras que en el grupo HC+Stevia se presentó un incremento en el tamaño promedio de célula (20.2%), y únicamente una tendencia a incrementar su promedio celular.

SrB en la dinámica de expresión-secretión de insulina

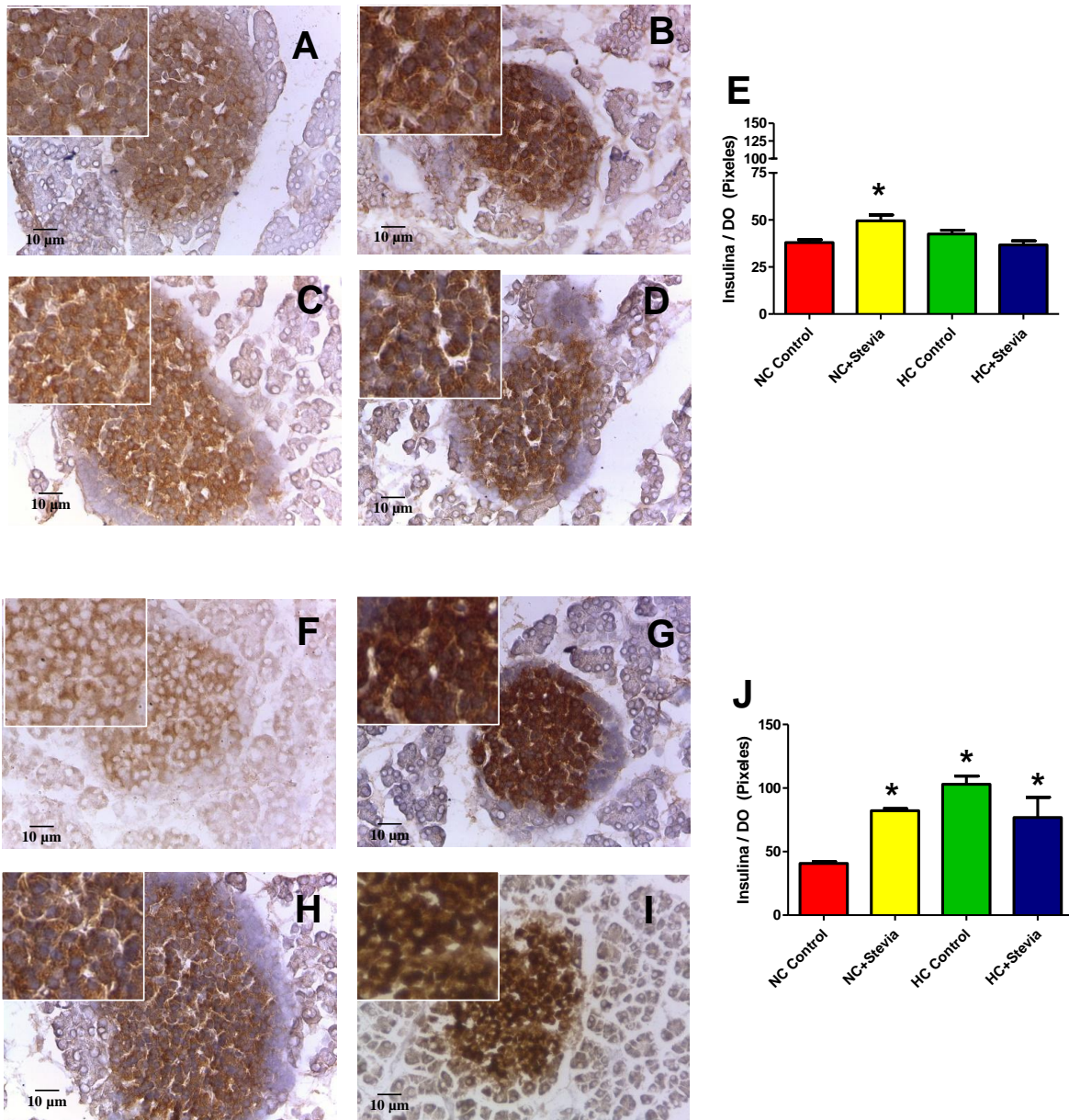


Figura 10. Estudio inmunohistoquímico del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de insulina en ayuno y post-prandio. [A-B (Ayuno) F-G (Post-prandio)] Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos control NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. **[C-D (Ayuno) H-I (Post-prandio)]** Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 40X. **(E y J)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para insulina (Píxeles), en ayuno arriba y post-prandio abajo. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

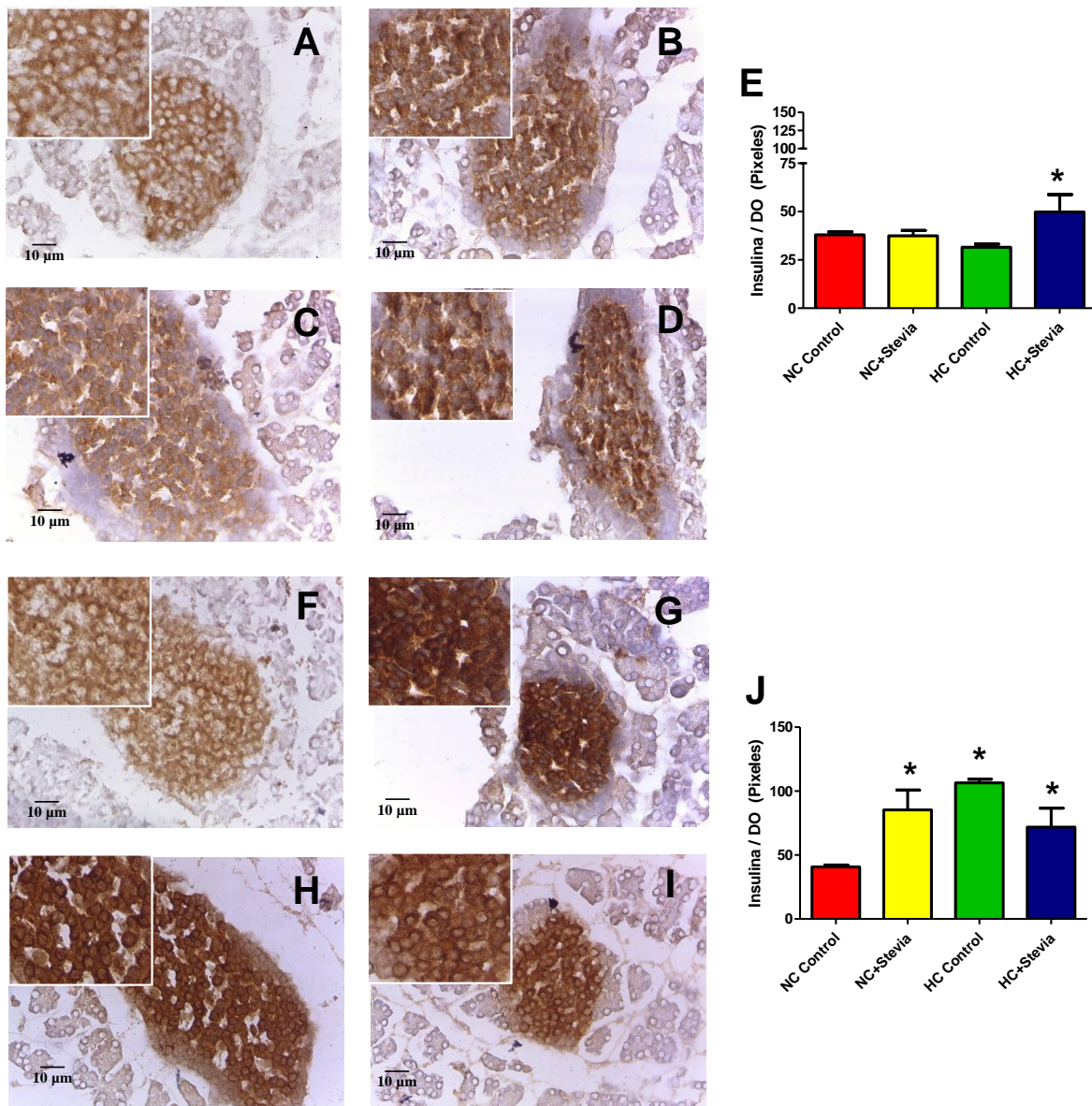


Figura 11. Análisis inmunohistoquímico del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de Insulina en ayuno y post-prandio. [A-B (Ayuno) F-G (Post-prandio)] Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos control NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. **[C-D (Ayuno) H-I (Post-prandio)]** Se muestran fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 40X. **(E y J)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para insulina (Pixeles), en ayuno arriba y post-prandio abajo. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Posterior al análisis de -trofia y -plasia, se procedió a hacer un análisis histoquímico de la presencia de insulina tanto en el ayuno como en el postprandio, mediante un análisis densitométrico de las fotomicrografías, se encontró que luego de 30 días la administración del extracto de SrB incrementó a la hormona en el tejido productor tanto en ayuno (30.6%) y el postprandio (102.1%), un comportamiento similar fue observado a los 60 días en este grupo en el post-prandio 89.9%. Mientras que en el grupo HC solo en el postprandio se observó dicho incremento a 30 días (153.2%) y a 60 días (161.8%). El grupo HC+Stevia no mostró diferencias después de 30 días de administración en el ayuno, sin embargo, en el postprandio observó un incremento de 88.9%; mientras que al día 60 de administración del extracto incrementó en ayuno 31.4%, y en el postprandio (76.5%). Lo observado ante una administración de Stevia se traduce en una señalización que incrementa la capacidad de generación de insulina, la cual se sostuvo inclusive ante el estímulo sostenido de una administración crónica.

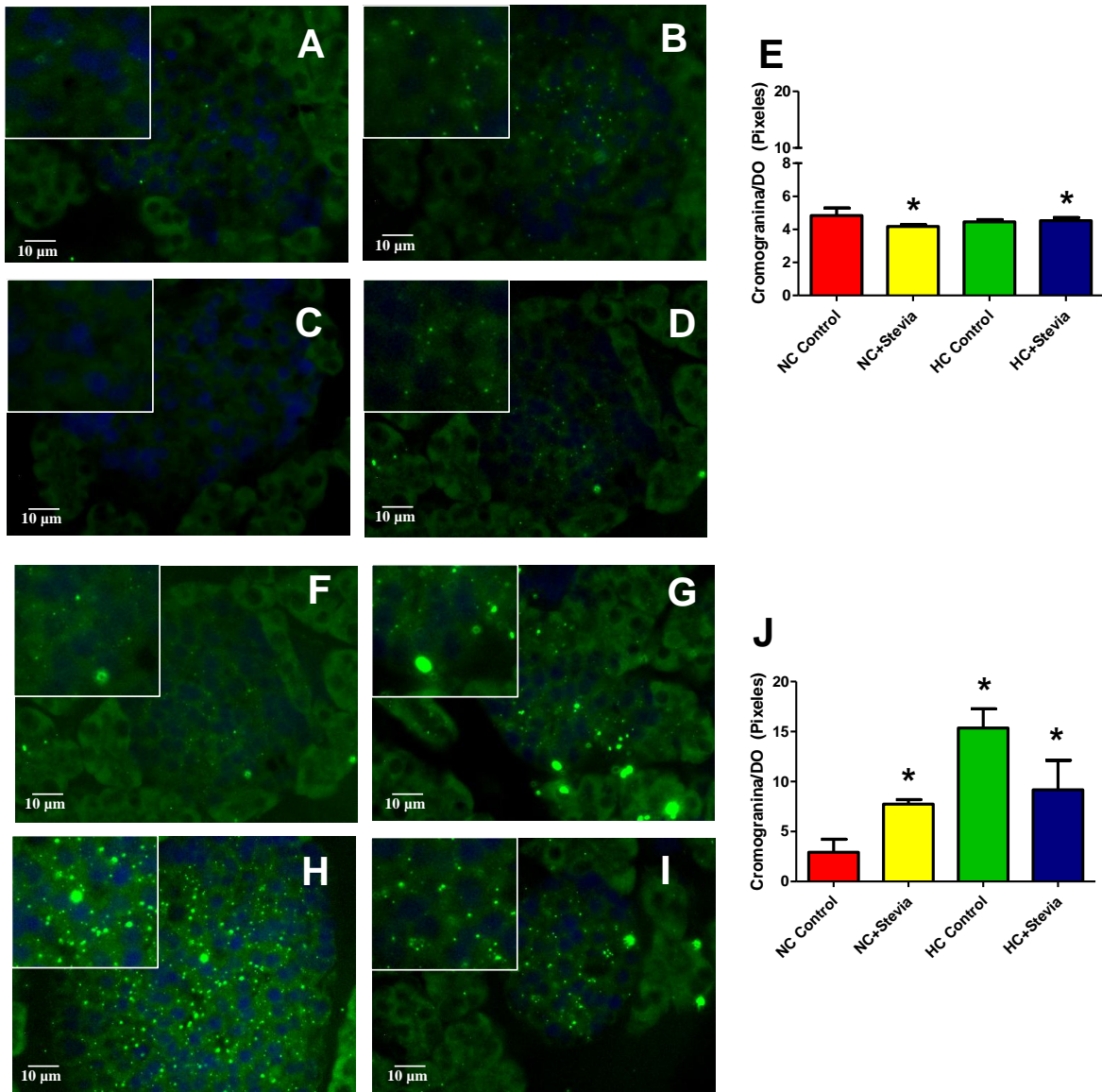


Figura 12. Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de cromogranina en ayuno y post-prandio. [A-B (Ayuno) F-G (Post-prandio)] Se muestran fotomicrografías representativas del grupo control NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 60X. [C-D (Ayuno) H-I (Post-prandio)] Muestran fotomicrografías representativas del grupo con dieta HC y HC+SrB, con un objetivo 60X. (E y J) Cuantificación densitométrica de la marca positiva para cromogranina (Píxeles), en ayuno arriba y post-prandio abajo. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$

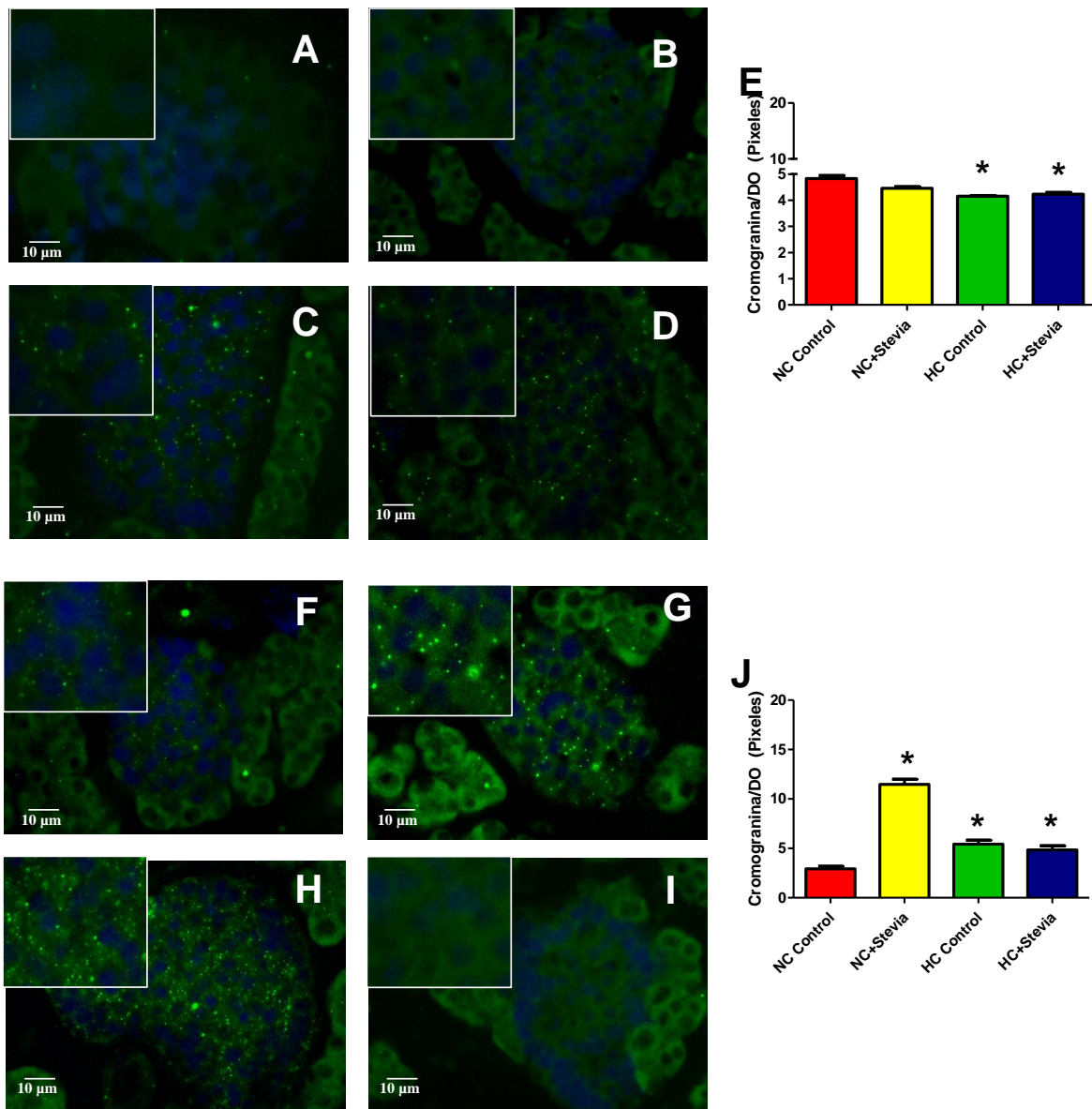


Figura 13. Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de cromogranina en ayuno y post-prandio. [A-B (Ayuno) F-G (Post-prandio)] Se muestran fotomicrografías representativas del grupo control NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 60X. [C-D (Ayuno) H-I (Post-prandio)] Muestran fotomicrografías representativas del grupo con dieta HC y HC+SrB, con un objetivo 60X. **(E,J)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para cromogranina (Píxeles), en ayuno arriba y post-prandio abajo. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Esta insulina, a su vez, se encuentra contenida en gránulos que además de la hormona contienen moléculas como la cromogranina A (CgA), la cual se almacena en los gránulos cromafines del gránulo secretor por lo que es un buen marcaje para corroborar el tamaño de gránulo de almacenaje de insulina o la relación gránulo/insulina. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se evaluó la marca positiva para esta proteína en el páncreas, ante lo que se encontró que en ayuno a 30 días, se presentó una disminución en los grupos NC+Stevia y HC+Stevia correspondientes a 13.5% y 6.2%, sin cambio en el grupo HC. Luego del estímulo dado por la TOG (Prueba de tolerancia oral a glucosa) (postprandio, 90 min), en los diferentes grupos se observó un incremento de la inmunoreactividad para la proteína correspondiente a 166% (NC+Stevia), 427.5% (HC) y 215.1% (HC+Stevia). Después de 60 días de administración, una disminución significativa fue observada tanto en HC, como en HC+Stevia en ayuno (13.9% y 12.2%, respectivamente), mientras que en postprandio el inmunomarcaje se mostró incrementado en 293.8% (NC+Stevia), 86.6% (HC) y 66% (HC+Stevia), respectivamente comparados con el grupo control NC, lo que indica gránulos más grandes y preparados para responder ante la señal de liberación.

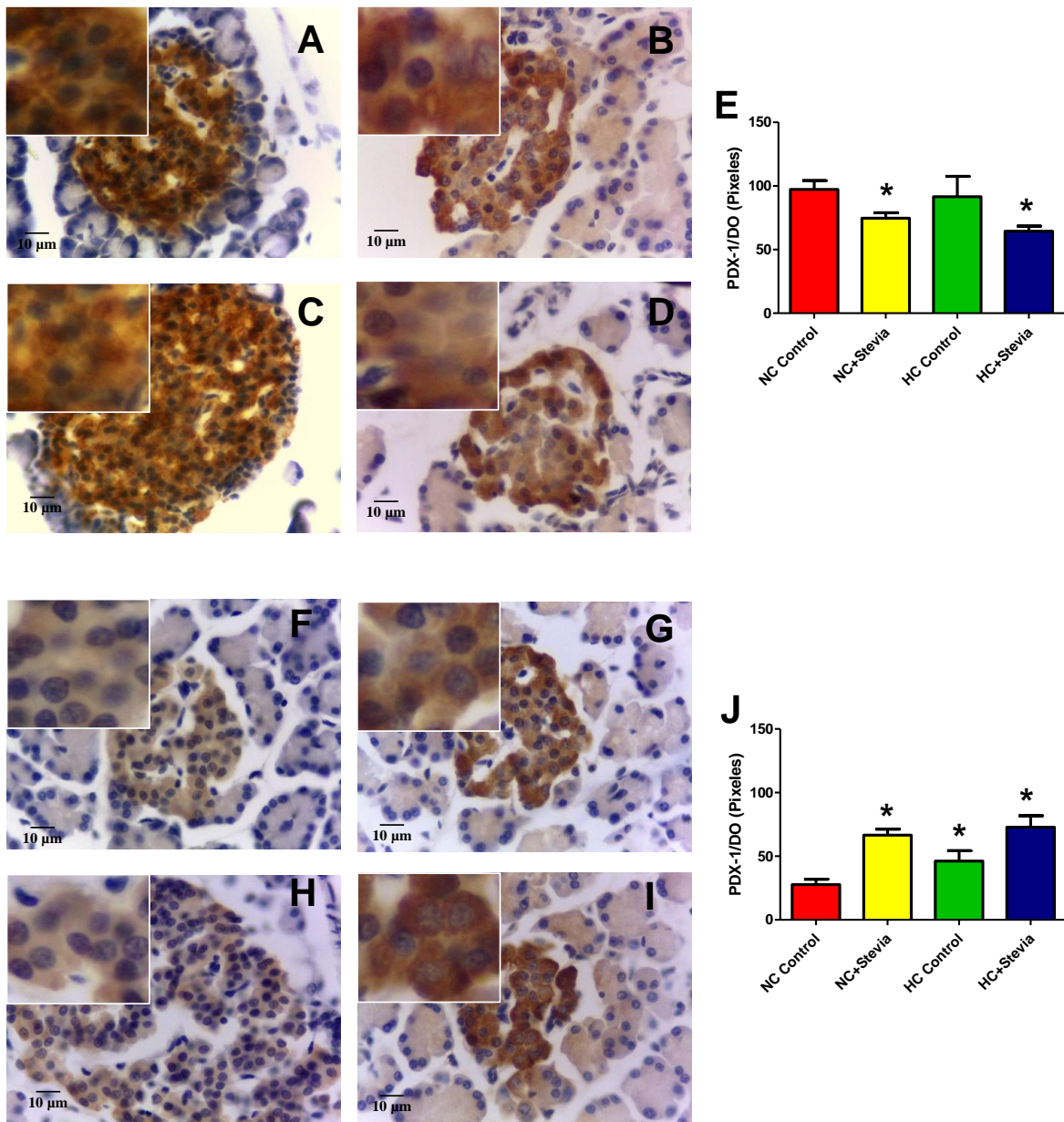


Figura 14. Análisis inmunohistoquímico del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de PDX-1 en ayuno y post-prandio. [A-B (Ayuno) F-G (Post-prandio)] Fotomicrografías representativas de los grupos NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. **[C-D (Ayuno) H-I (Post-prandio)]** Fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 40X. **(E y J)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para PDX-1 (Píxeles), en ayuno arriba y post-prandio abajo. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

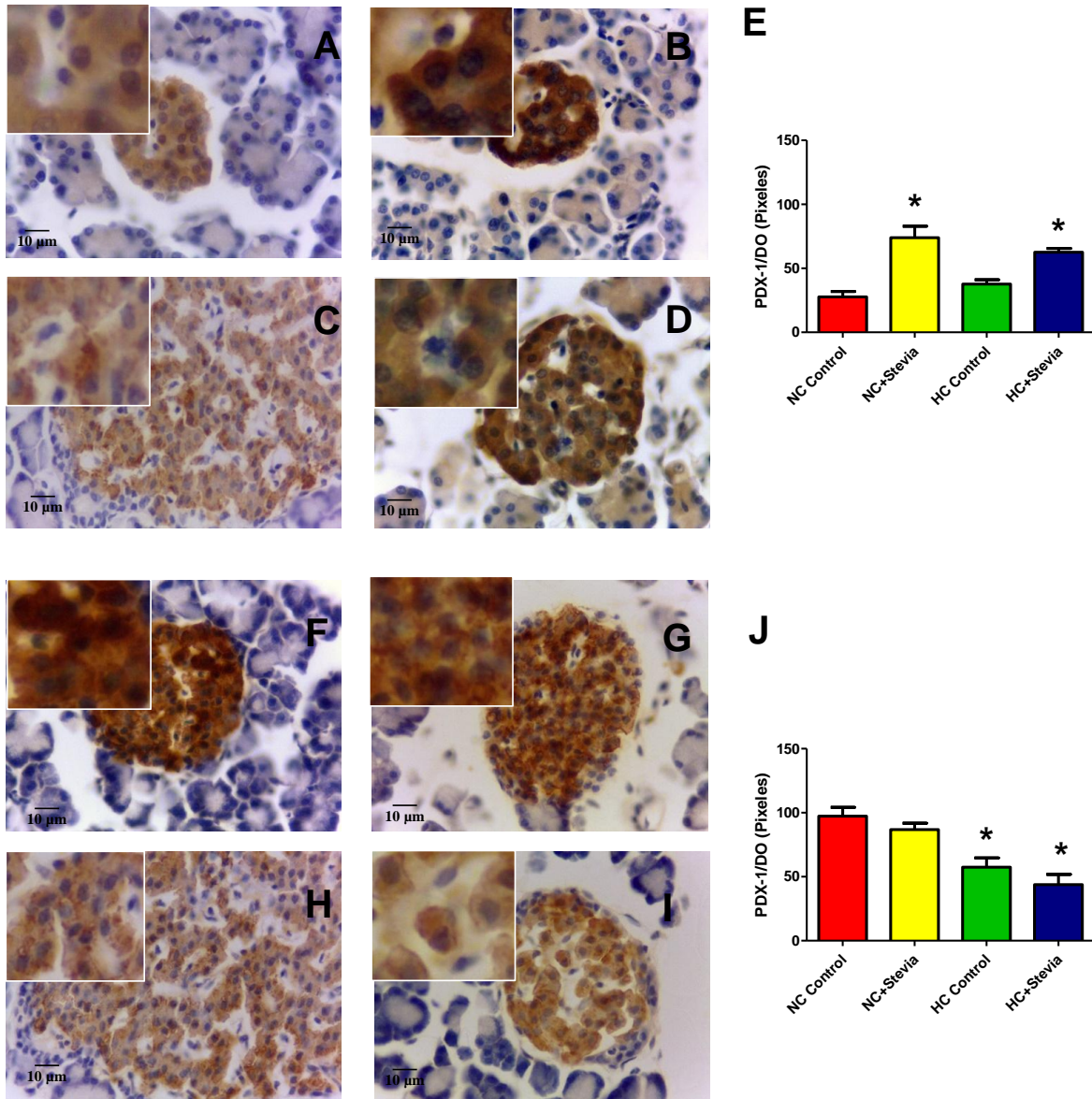


Figura 15. Análisis inmunohistoquímico del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de PDX-1 en ayuno y post-prandio. [A-B (Ayuno) F-G (Post-prandio)] Fotomicrografías representativas de los grupos NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 60X. **[C-D (Ayuno) H-I (Post-prandio)]** Fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 60X. **(E y J)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para PDX-1 (Pixelles), en ayuno arriba y post-prandio abajo. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

La señal de generación de insulina, están dadas por diversas moléculas y factores de transcripción entre los que destaca como el principal, PDX-1, quien además se ha descrito que es un regulador de la sobrevivencia de células β . El análisis inmunohistoquímico de PDX-1 en ayuno tras 30 días de administración del extracto muestra que los grupos disminuyen significativamente NC+Stevia y HC+Stevia en 23.2% y 33.8% respectivamente. Mientras que en el postprandio los grupos NC+Stevia, Control HC y HC+Stevia presentaron un incremento en la inmunorreacción que correspondió a 140.7%, 66.8% y 164.5%, respectivamente. A 60 días de administración del extracto el inmunomarcaje incrementó en los grupos NC+Stevia (168.36%) y HC+Stevia (126.09%). En relación a la administración exógena de glucosa, se observó menor reactividad para el PDX-1 en los grupos Control HC (41%) y HC+Stevia (54.9%), mostrando que este factor de transcripción está siendo utilizado para la generación de la insulina necesaria ante el estímulo de glucosa.

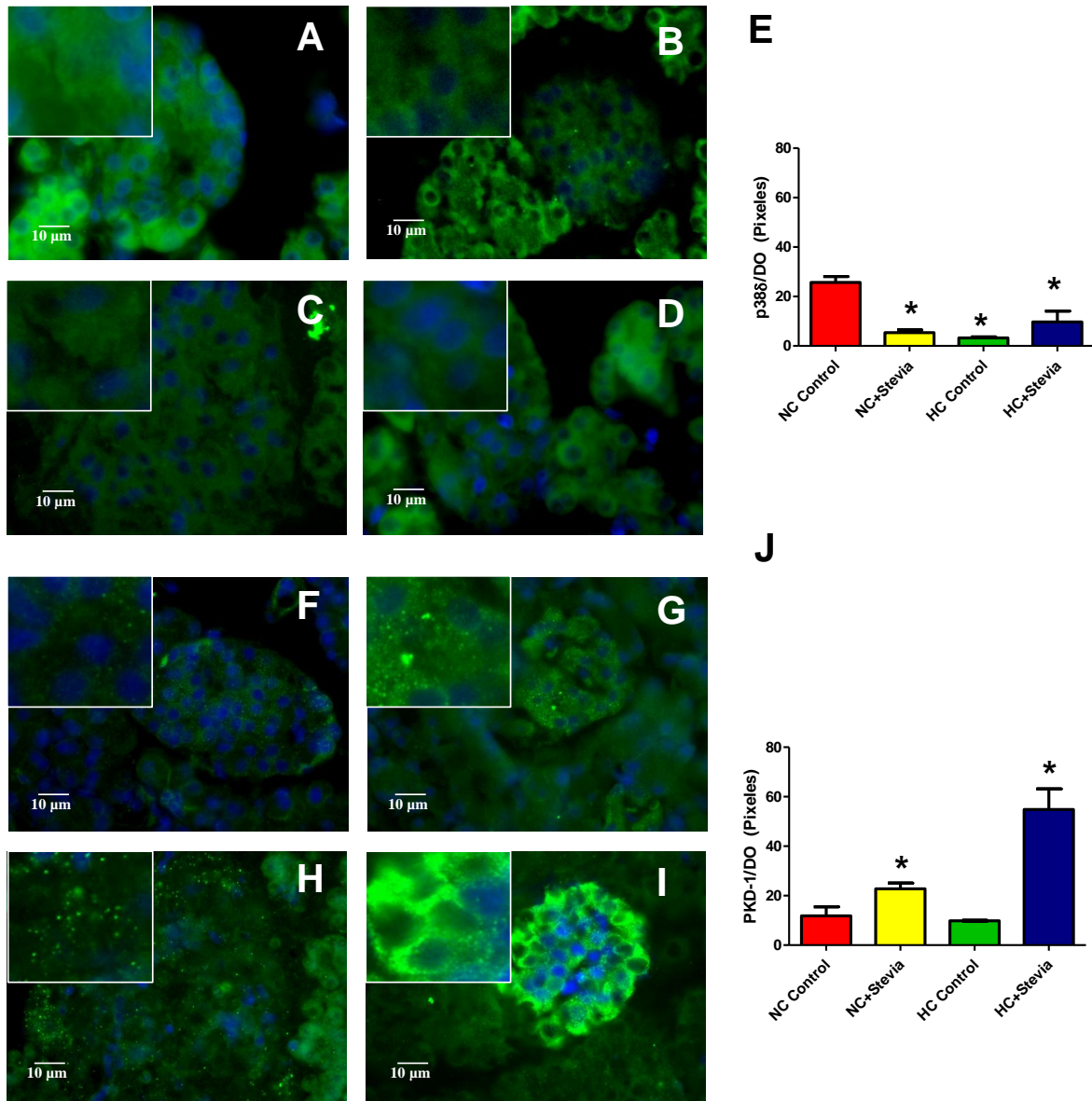


Figura 16. Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de P38δ (arriba) y PKD-1 (abajo). [A-B (p38δ) F-G (PKD-1)] Fotomicrografías representativas de los grupos NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. **[C-D (p38δ) H-I (PKD-1)]** Fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 60X. **(E y J)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para p38δ (arriba) y PKD-1 (abajo) (Píxeles). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

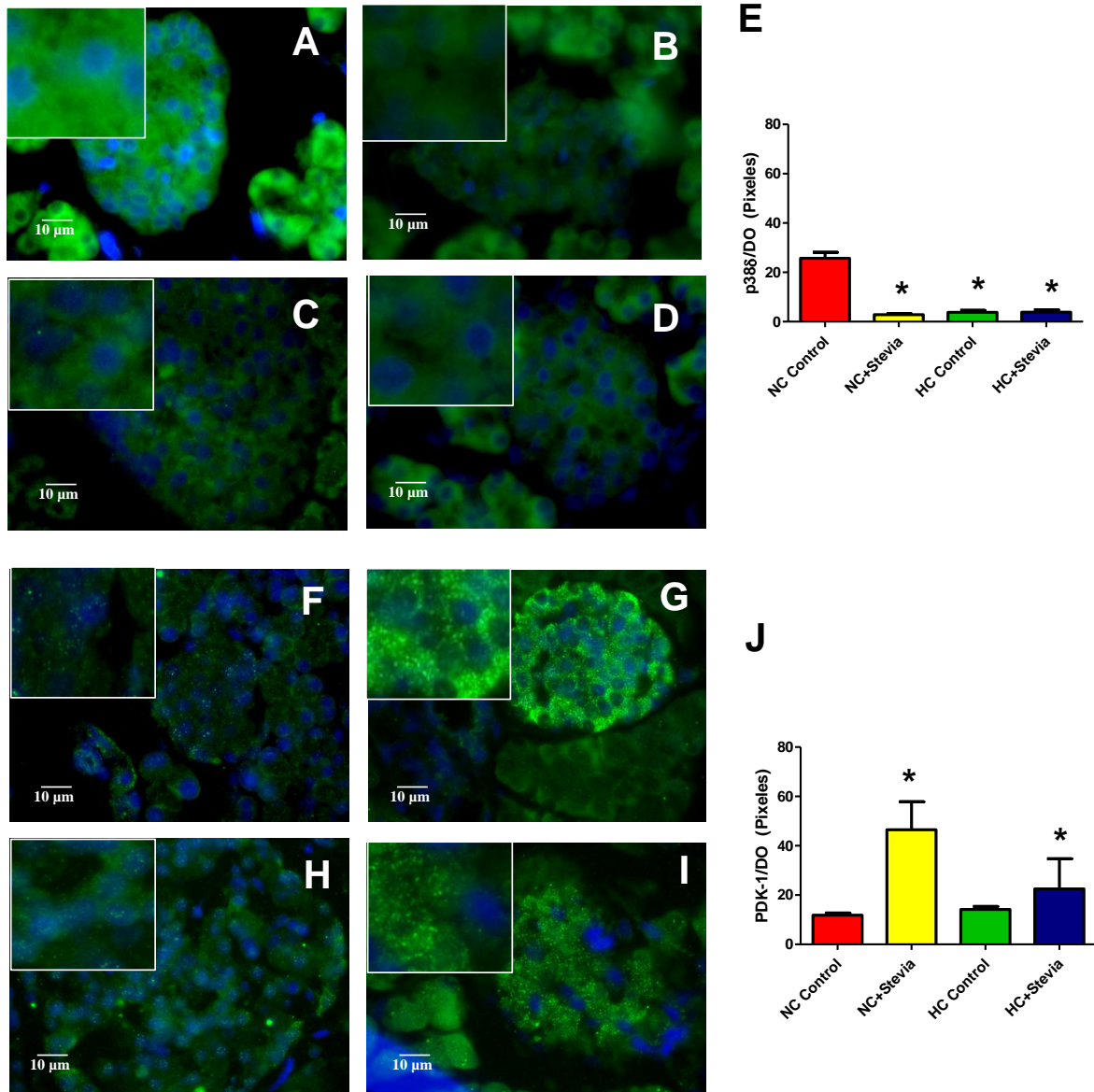


Figura 17. Estudio de inmunofluorescencia del efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de P38δ (arriba) y PKD-1 (abajo). [A-B (p38δ) F-G (PKD-1)] Fotomicrografías representativas de los grupos NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. [C-D (p38δ) H-I (PKD-1)] Fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 60X. (E y J) Cuantificación densitométrica de la marca positiva para p38δ (arriba) y PKD-1 (abajo) (Píxeles). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

SrB y su participación en rutas no canónicas de secreción de insulina.

La insulina es una hormona cuya secreción está regulada por más de una vía, las cuales se consideran como rutas no canónicas de secreción de la hormona, se ha descrito que un par de moléculas clave en dicha regulación son p38 δ y PKD-1 por lo que fue analizada su expresión para ambas moléculas en los islotes de Langerhans. Los resultados mostraron que para p38 δ , existe una disminución respecto al grupo control NC en los grupos NC+Stevia a 30 días (79%) y a 60 días de administración (88.9%), así como para el grupo Control HC (87.3%, 30 días; 85.4%, 60 días) y el grupo HC+Stevia (62.2%, 30 días; 85.2%, 60 días). Mientras que para PKD-1 el análisis mostró un incremento en los grupos tratados con SrB tanto con dieta normocalórica (92.6%, 30 días; y 292.8%, 60 días), como con dieta hiperglúcida-hipercalórica (363.5%, 30 días; y 90%, 60 días) en ambos tiempos corte.

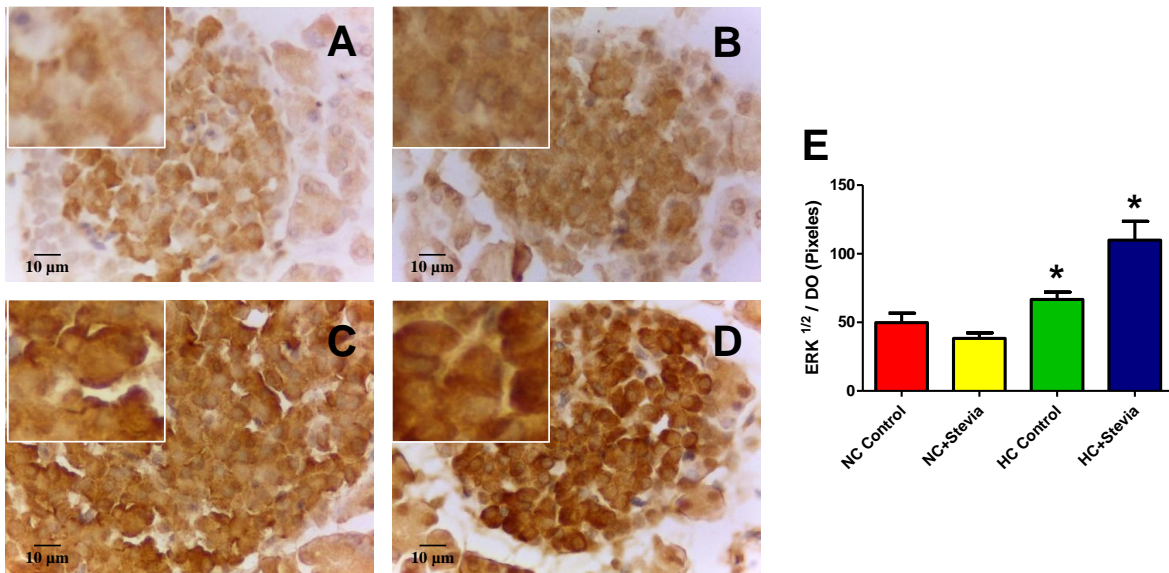


Figura 18. Efecto de la administración por 30 días del extracto de SrB sobre la expresión de ERK 1/2. (A-B) Fotomicrografías representativas de los grupos NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. (C-D) Fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 40X. (E) Cuantificación densitométrica de la marca positiva para ERK 1/2 (píxeles). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

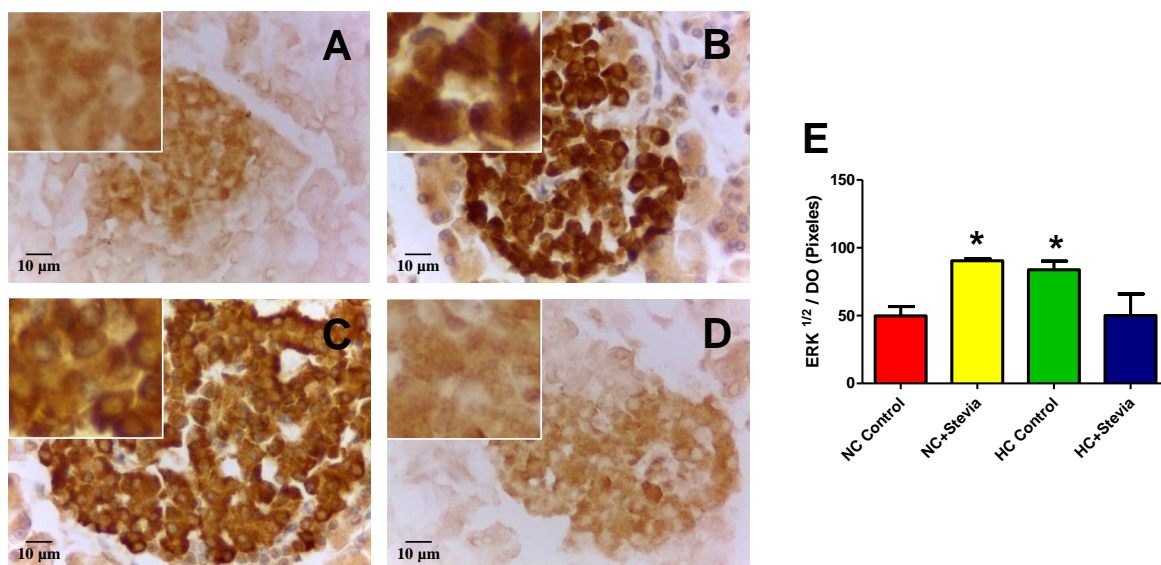


Figura 19. Efecto de la administración por 60 días del extracto de SrB sobre la expresión de ERK 1/2. (A-B) Fotomicrografías representativas de los grupos NC y NC+SrB, respectivamente con un objetivo de 40X. **(C-D)** Fotomicrografías representativas de los grupos HC y HC+SrB, con un objetivo 40X. **(E)** Cuantificación densitométrica de la marca positiva para ERK 1/2 (píxeles). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Sin embargo, han sido descritas otras rutas no canónicas reguladas por receptores estrogénicos que al ser activados por un ligando desencadenan vías de señalización en las que participan moléculas como ERK 1 y 2; éstas en la vía de secreción insulina, juega un papel importante al ser capaz de activar a NeuroD1, un factor de transcripción positivo para la síntesis de insulina, por ello su estudio fue interesante en este modelo; al realizar las IHQ para estas proteínas, los hallazgos obtenidos fueron un incremento respecto al grupo control NC, a los 30 días, en los grupos Control HC (33.9%) e HC+Stevia (120.7%), y a los 60 días, para los grupos NC+Stevia (113.6%), Control HC (98%) y HC+Stevia (58%), evidenciando con ello su posible participación en la ruta de secreción insulínica; una vez teniendo esta evidencia, y con la finalidad de evaluar más de esta vía regulada por receptores estrogénicos, se evaluaron las concentraciones séricas de β -2 estradiol y testosterona en los animales, para descartar la posibilidad de que incrementos en ellas pudieran estar causando la activación de la vía de

secreción; ante ello se encontró que únicamente hubo cambios significativos en el grupo Control HC; en los niveles de β -2 estradiol presentó un incremento de 62.2% a los 30 días y de 134.2% a los 60 días, mientras que testosterona, mostró un decremento al mes de tratamiento (71.3%) y un aumento a los dos meses de administración del extracto de SrB (233.3%). Es de resaltar, que los grupos NC+Stevia e HC+Stevia no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control NC.

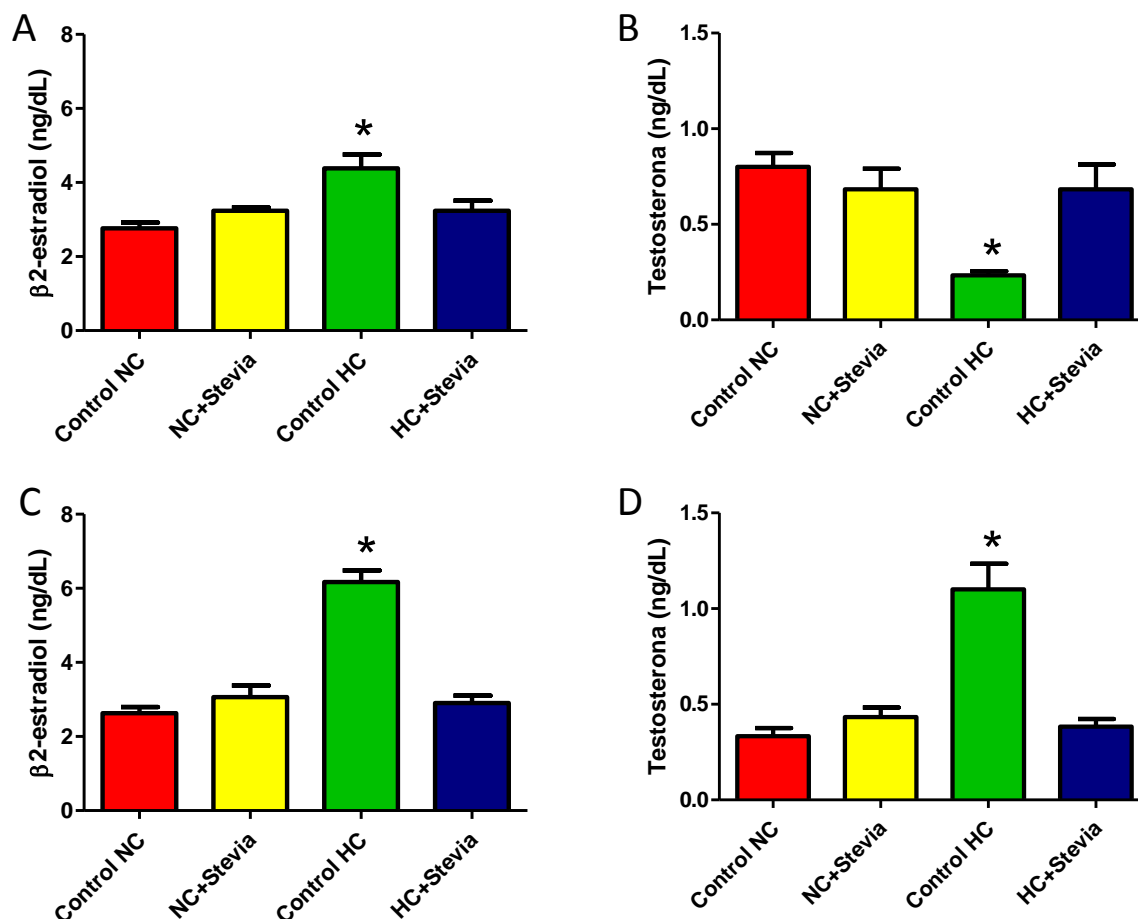


Figura 20. Efecto de la administración por 30 y 60 días del extracto de SrB en la concentración de estradiol y testosterona. Determinación de estradiol (izquierda) y testosterona (derecha), para 30 días (A-B) y 60 días (C-D) en color rojo se representa el grupo Control NC, en amarillo el alimentado con dieta NC y administrado con Stevia, en verde el grupo de la dieta HC, y en azul el grupo alimentado con dieta HC y administrado con Stevia. Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba ANOVA de una vía post hoc Bonferroni. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Estos hallazgos, nos hicieron pensar en una manera en la cual los glucósidos de SrB pudieran estar interaccionando con los receptores estrogénicos a fin de activar las vías de secreción de insulina en las que están involucrados, por lo que se evaluó mediante modelamiento in silico la probabilidad de interacción del receptor de estrógenos β con el esteviol. (Anexo 25)

10. DISCUSIÓN

Dietas hipercalóricas y sus implicaciones metabólicas tempranas

A lo largo de diferentes estudios, se ha asociado a las dietas hipercalóricas con desórdenes nutricionales, endócrinos, cardiovasculares y metabólicos, teniendo todos ellos como factor común a la resistencia a insulina. Esta afección es un proceso complejo que difícilmente puede ser explicado por una sola etiología y que involucra la alteración de múltiples vías de señalización relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos lo que principalmente resulta en obesidad y disglucemias; que implican también procesos de inflamación y estrés oxidativo íntimamente relacionados con el desarrollo de cáncer y DM2. (Sun Ha Jee, 2005)

Si bien la obesidad y la DM2 se han relacionado con procesos de estrés oxidativo en estados crónicos, tal como lo reportó Furukawa en 2004, al encontrar un incremento en la producción total de ROS, citoquinas inflamatorias y en la actividad de la NADPH oxidasa en adipocitos de ratones obesos, (Shigetada Furukawa, 2004) los estados tempranos son pobremente estudiados, pero como bien se sabe, así como el organismo produce diferentes ROS, también posee una importante maquinaria de defensa para regular la producción de estas, que incluye a enzimas como CAT, SOD, GPx, GSR, Hemoxigenasa y moléculas como la Vitamina A, C, E, glutatión y tioredoxinas; de tal manera que, es hasta que la capacidad antioxidante de la célula es superada, cuando se habla propiamente de estrés oxidativo. Uno de los mejores indicadores de este fenómeno, es el radio GSSG/GSH, que denota una mayor protección en valores menores, aunado a esto, existen rutas de señalización que han descrito que la producción de ROS, inducen a la expresión factores de transcripción como NRF2 (Factor nuclear eritroide 2 como 2) y ARE (Elemento de respuesta antioxidante) que activan genes antioxidantes, NFκB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) genes proinflamatorios y el complejo AP1 (Proteína activadora 1), CREB (Elemento de respuesta y unión a APMc) y Egr-1 (Proteína de respuesta de crecimiento temprano tipo 1) que estimulan genes de proliferación, estos factores son activados por la vía de MAP cinasas; capacitando de una mejor manera a la célula para responder ante la producción de ROS (Birben E,

2012) (Asima Bhattacharyya, 2014). Nuestros resultados en el grupo Control HC, en todos los tejidos, parecen estar aún en esta fase adaptativa en la cual el balance se inclina al lado opuesto del estrés oxidativo, lo cual es evidenciado por una mayor actividad de CAT, y una menor concentración de GSSG, y MDA.

Se ha descrito además, que el consumo crónico de dietas hipercalóricas, ocasiona desvíos en las rutas metabólicas tisulares, debido a un incremento en la producción de intermediarios de vías metabólicas que la célula tiende a almacenar en exceso en forma de grasa, en primera instancia en el tejido especializado para ello, el tejido adiposo, sin embargo, gran parte de la patogenia de la obesidad se centra en la acumulación ectópica de triglicéridos en tejidos no capacitados para ello como son hígado, músculo, corazón, riñón y páncreas, proceso conocido como esteatosis. (Shulman, 2012)

Esta acumulación excesiva de grasa en los tejidos, en condiciones normales no se genera, ya que tanto la síntesis de QM intestinales para distribuir lípidos exógenos como la lipogénesis de *novo* dada por el hígado formando VLDL, distribuyen primordialmente estos triglicéridos a tejido muscular y secundariamente a adiposo, y solamente una pequeña proporción al resto de los tejidos; las pequeñas reservas de grasas intracelulares de los órganos no adiposos se utilizan para funciones esenciales de las células, como la manutención de las membranas, la fluidez y las señales celulares. Pero el depósito de un modesto exceso de grasa dentro de un tejido magro provoca cambios clínicos, como resistencia a la insulina, hígado graso, cardiomiopatía y DM2. Roger Unger y Denis McGarry, en 1994, tomaron el término lipotoxicidad para denominar a la disfunción que produce la presencia anormal de grasa en un órgano o tejido magro, y que puede incluso inducir a la muerte celular (lipoapoptosis), por todo ello, al tener en este modelo un mayor aporte energético, es de esperarse que la producción de metabolitos de resguardo sea mayor, y el resguardo primo en tejido adiposo sea superado (YOUNG LEE, 1994).

En nuestro trabajo experimental, los animales del grupo Control HC, mostraron un mayor resguardo lipídico en tejido adiposo, músculo y páncreas, mostrando con ello evidencia de esteatosis, no así en corazón, donde se observó una disminución de los

niveles de triglicéridos; algo importante a tomar en cuenta ya que una de las acciones primordiales del corazón es el suministro de irrigación sanguínea para la distribución de nutrientes necesarios para tejidos periféricos. Para ello la función contráctil es primordial en el proceso de bombeo, llevándose a cabo de tal manera que es necesario un suministro constante de ATP; el ATP es primordialmente obtenido de la catálisis de ácidos grasos libres (AGL), y secundariamente de cuerpos cetónicos y glucosa (William C. Stanley, 2004).

Ante el consumo constante de dietas hipercalóricas, el gasto cardíaco exigido por el sistema incrementa sobremanera, con lo que en primera instancia, la oxidación de AGL es acelerada, disminuyendo sus reservas de TAG para obtener la energía que su proceso funcional le implica; sin embargo, conforme pasa el tiempo existe pérdida paulatina en la homeostasis y balance metabólico, potenciado por un sobre estímulo pancreático con hiperinsulinemias compensadoras, conllevando a que la glucosa se convierta en el sustrato preferencial para el metabolismo cardíaco, ya que proporciona una mayor eficiencia en la producción de productos de alta energía comparado con los AGL (Roxana Carbó, 2002) (William C. Stanley, 2004). Este decremento en la ruta metabólica oxidativa de AGL aunado al estado hiperinsulinémico promueve el incremento de la glucogenólisis cardíaca (William C. Stanley, 2004).

De manera consistente se ha mencionado que la lipotoxicosis tisular, tiene repercusiones en otras rutas importantes como el resguardo glucogénico, en este sentido, la insulina promueve una mayor captación de glucosa del medio en tejidos dependientes de la hormona, y con ello las reservas de glucógeno se ven incrementadas, Sarmiento-Ortega en 2014 y Treviño en 2015, reportaron que en un modelo de síndrome metabólico inducido por dieta hipercalórica, existía un mayor resguardo de glucógeno en músculo, hígado y riñón (Sarmiento-Ortega, 2014; Treviño, 2015). Lo cual concuerda con el incremento de glucógeno en músculo y páncreas observado en nuestro grupo Control HC. En este mismo sentido, observamos que al contrario de la tendencia dada por insulina en los tejidos, en nuestro grupo administrado con la dieta hipercalórica, en corazón se presenta un menor resguardo de esta molécula, lo cual puede deberse a dos factores determinantes, en

primera instancia, el cambio de sustrato energético principal (ácidos grasos) asociado a una mayor glucogenólisis a expensas de las reservas tisulares (William C. Stanley, 2004); y por otra parte, se ha descrito que en estados de resistencia a insulina, ésta no bloquea la actividad de la GSK3 β , con lo que la actividad de la glucógeno sintasa se ve disminuida, motivo por el cual el resguardo va en decremento. (Shulman, 2012).

Parte del ciclo homeostático de glucosa y triglicéridos, implica que ante un incremento plasmático de glucosa, el páncreas secreta insulina, señalizando así el paro gluconeogénico, y promoviendo glucogénesis hepática, además de inducir al tejido adiposo a detener vías lipolíticas, estimulando al mismo tiempo lipogénesis. Sin embargo, al existir alteración en las acciones de insulina y como se describió anteriormente, estas rutas no se están llevando a cabo bajo condiciones fisiológicamente habituales, primeramente, habrá un remanente de glucosa circulante que no llega a los tejidos, lo cual se vuelve evidente en el comportamiento de las curvas de tolerancia a glucosa que cambian su comportamiento en relación al grupo normocalórico.

Crónicamente dichos estímulos se han relacionado con un aporte gluconeogénico hepático, que estaría aportando un extra de glucosa de manera continua, incluso ante estados hiperinsulinémicos, lo cual se ha descrito como el inicio de la resistencia a la hormona, tal como lo describieron Ghani M y DeFronzo en 2016, al comparar las implicaciones de este fenómeno de glucosa alterada en ayunas en relación a la glucosa alterada en el postprandio (Abdul-Ghani, 2016). Adicionalmente ambos comportamientos están en concordancia con niveles elevados de triglicéridos, colesterol total y sus fracciones VLDL y LDL. En conjunto se han considerado indicadores inequívocos del desarrollo de síndrome metabólico. Las dislipidemias, pueden ser debidas a una falta en la detención de la lipólisis adipocitaria característica también de la resistencia a insulina o bien por una lipólisis excesiva por parte de corazón, que correlacionaría en gran manera los niveles disminuidos de triglicéridos en este tejido; todos estos procesos en conjunto estarían aportando un flujo constante de AGL hacia suero, que para volver a redistribuirse a los tejidos, deberían llegar a hígado para que mediante las VLDL, se envíen de nuevo a circulación e insulina de la

señal a la LPL de los tejidos para que permita la deslipidación de estas lipoproteínas, proceso que ha sido evaluado mediante el corrimiento electroforético de lipoproteínas en gel de poliacrilamida tal como lo hizo Warnick en 2006, mostrando la utilidad de esta técnica para evaluar la distribución de las diferentes subclases de HDL y LDL bajo la influencia de distintos factores como género, edad, dieta, alcohol y fumadores, esta técnica permite la separación de las lipoproteínas de acuerdo a su tamaño, y de esta manera no solo permite observar la proporción de proteínas VLDL, LDL y HDL, sino que además en un análisis más profundo, puede incluso estimar un porcentaje de cada una de las subfracciones de estas lipoproteínas, apoyando de esta manera a determinar el riesgo aterogénico del individuo en cuestión al correlacionar los porcentajes con las subclases más propensas a oxidarse que son las LDL_{VIIb} y HDL_{3c}, cuyo lugar dentro del corrimiento electroforético se sitúa al final de la zona de cada una; el comportamiento que se observa en el corrimiento electroforético de lipoproteínas de nuestro grupo Control HC, muestra una disminución en las fracciones HDL y LDL y nos permite predecir que es a expensas de las fracciones más aterogénicas de estas y que el comportamiento de las fracciones menos aterogénicas se sitúa dentro de la distribución normal, sin embargo debería hacerse un análisis más minucioso para poder aseverar esto de una manera contundente. (Warnick GR, 2006)

Ahora bien, como ya se describió anteriormente, las consecuencias que las desregulaciones metabólicas tienen en el organismo son muy graves y van en deterioro de la calidad de vida de los individuos, los tratamientos eficaces y seguros son imprescindibles, pese a esto; el público los exige a una velocidad tal, que en ocasiones mengua la investigación que se hace en ellos, y es aquí, donde el estudio a detalle de los tratamientos no farmacológicos con mayor auge cobra importancia.

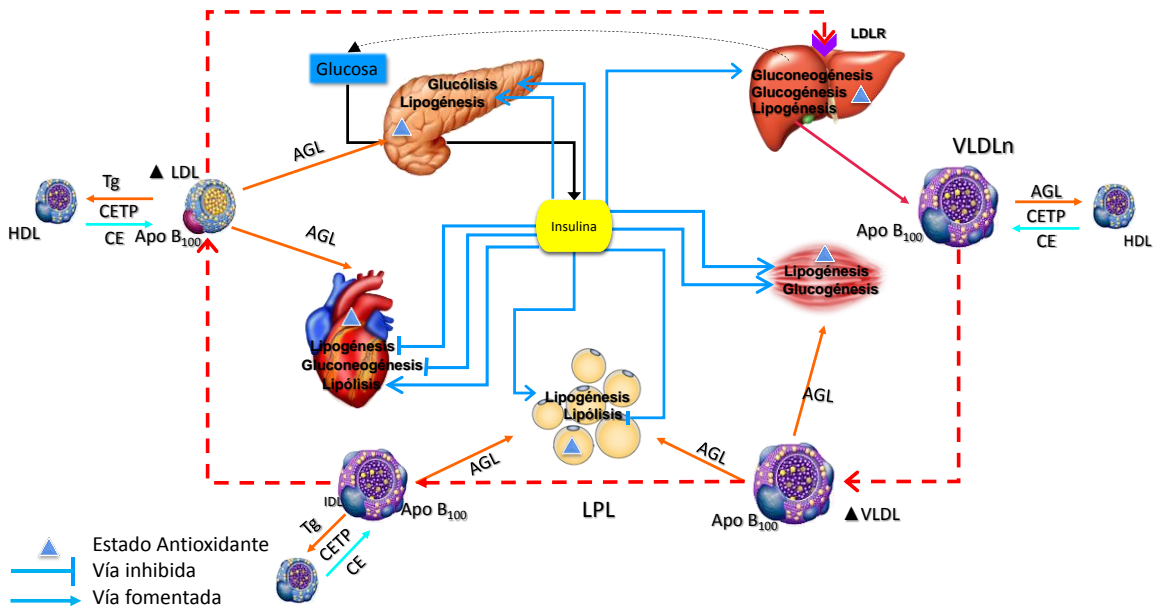


Figura 21. Efecto de la dieta hiperglúcida hipercalórica sobre el metabolismo y el balance redox tisular a 30 y 60 días de administración

Impacto metabólico tisular de la administración del extracto de SrB

Acorde a los reportes que se tienen, el consumo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, ha incrementado considerablemente en los últimos 4 años, y se espera que aumente aún más para el 2020, según un análisis de mercado realizado por Future Market Insights en 2014, esto es entendible debido a la variedad de beneficios que ofrece.

Uno de los principales atributos, es su actividad antioxidante; diversos autores como Sunanda Singh, N. Shivana y R. Sharma, han evaluado esta actividad antioxidante en modelos diabéticos, encontrando incrementos en las enzimas SOD y CAT, y en la concentración de GSH reducido, efecto que se le ha atribuido principalmente a la presencia de polifenoles y flavonoides en el extracto que son capaces de donar electrones para estabilizar las moléculas radicalarias, según Hazzit en 2009, Shivana en 2013 y Ruiz Ruiz en 2014, esta actividad potencialmente antioxidante se observa en todos los tejidos de nuestros dos grupos tratados con Stevia (NC+Stevia e HC+Stevia) a los dos meses; al mes por el contrario, pese al tratamiento con SrB, y el hecho de que la actividad de SOD esta incrementada, se observó un marcado

incremento en el GSSG; estado que se ha asociado al incremento en el metabolismo celular, potenciado por las acciones de insulina, (Francesca Bonomini, 2015); Shivana en 2013, cuando describió los componentes del extracto de SrB, reportó la presencia de metales como hierro y cobre, los cuales se sabe que pueden inducir la formación de radicales libres mediante reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (I.Kruk, 1998); Ruiz Ruiz por su parte, observó que SrB tiene además una capacidad quelante de estos metales, pero que es tiempo y dosis dependiente (Ruiz Ruiz JC, 2014); lo cual podría justificar que al primer mes exista un incremento en los radicales libres, y posteriormente sean captados por GSH, lo cual llevaría a un incremento de GSSG.

Adicionalmente se debe contemplar el incremento de ROS secundarios a la propia alteración metabólica influenciadas por insulina, movilidad lipídica y de carbohidratos en los diferentes tejidos analizados; ante una administración crónica, el efecto quelante del mismo extracto, pudiese mantener la formación de radicales libres por estas vías, con ayuda de los flavonoides y polifenoles suministrados continuamente, se estaría llevando a cabo la detoxificación de radicales y ROS, por lo que al final de los dos meses, la cantidad de GSH reducido disponible para utilizarse sería mayor; esto sin olvidar que el tratamiento también puede potenciar proteínas de reciclaje del sistema glutatión como la glutatión reductasa y transferasa, además no se debe dejar pasar el hecho de rutas antioxidantes, proliferativas e inflamatorias que las mismas ROS inducen, y que son mecanismos de adaptación celular. (Shivanna N, 2013)

Estas tendencias oxidativas observadas, hacen referencia a la presencia de alteraciones a nivel metabólico en los tejidos. Al igual que ocurre en una dieta hipercalórica, donde la secreción insulínica es importante, una de las principales propiedades de SrB, es su actividad insulínica, Jeppesen en 2000 fue el primero en aseverar que Stevia estimulaba la secreción pancreática de insulina, y diversas investigaciones en modelos diabéticos, han mostrado que ante la administración de SrB, los niveles de insulina sérica incrementaron considerablemente en relación a los sujetos sin dicho consumo (P.B. Jeppesen, 2000) (Shivanna N, 2013). En este sentido, basados en el hecho que insulina es un modulador metabólico, y que en relación al consumo de SrB hay poco soporte bibliográfico que se enfoque al estudio tisular que

evalúen el resguardo de lípidos y glucosa en tejidos, se llevó a cabo este análisis en nuestros modelos observándose a nivel de tejido cardiaco y adiposo la disminución del contenido de TAG en los animales de los grupos NC+Stevia e HC+Stevia, tanto a corto como a largo plazo; en el caso de corazón, los resultados sugieren que el comportamiento observado puede ser debido al incremento del gasto cardiaco (por ser metabólicamente más activos), además de tener un estímulo dado por incrementos de insulina no necesariamente compensatorios como en el caso de la dieta HC, lo cual estimula la captación de glucosa del medio y aumenta la posibilidad de intercambio en el sustrato energético en corazón (Roxana Carbó, 2002).

Estas modificaciones llevan al debate de que si el tejido adiposo tiene la capacidad de almacenar el exceso de nutrientes provenientes de la dieta, la acumulación ectópica de lípidos no tiene lugar, no obstante, esta superación del límite de resguardo en tejido adiposo puede ocurrir, incluso en ausencia de obesidad, si está de por medio la presencia de moléculas inflamatorias como TNF- α y/o IL-6 (Michael B. Stout, 2007); el estímulo de estas condiciones por Stevia, fue evidenciado por Holvoet en 2014, al evaluar la expresión de estos genes en un modelo obeso y deficiente a leptina tratado con las moléculas activas del extracto de Stevia por un periodo de 12 semanas, mostrando que primordialmente, el Steviósido y Steviol tienen la capacidad de inducir estado proinflamatorio en los animales expuestos (Paul Holvoet, 2014). Acorde a esta aseveración, se puede hablar de una inducción positiva en la lipólisis adipocitaria que ocasiona una redistribución de AGL hacia otros tejidos, proceso que puede estar mediado además por la existencia de resistencia a insulina tal como lo reportó Shulman en 2012. (Shulman, 2012), (Michael B. Stout, 2007).

Este flujo extra de AGL, se dirige a tejidos magros, donde bajo condiciones de hiperinsulinemia se estimula el proceso de esterificación, mediado por las enzimas GPAT (Glicerol fosfato acil transferasa) y DGAT (Glicerol difosfato acil transferasa) (Cynthia A. Nagle, 2009), dando como resultado un incremento en el resguardo de triglicéridos a nivel de músculo, hígado y páncreas, fenómeno que se ha asociado con la participación de genes como PPAR γ (**Proliferador de peroxisoma activado por receptor gamma**), cuyas funciones incluyen la diferenciación

adipocitaria, la homeostasis de glucosa en su interacción con proteínas como IRS (Receptor del sustrato de insulina), PI3K (Cinasa de fosfatidil inositol 3), y Glut 4 promoviendo una mayor captación de glucosa del medio, además del metabolismo lipídico por estimulación de LPL, CD36 (Cluster de definición tipo 36) y ACS (Acetil coenzima A sintetasa); en 2014, Holvoet y colaboradores evidenciaron también que la administración de SrB ejerce una influencia positiva en la expresión de PPAR γ , Glut4, e IRS₂ (B Geeraert, 2010; Paul Holvoet, 2014); además, este resguardo crónico de TAG en tejidos no adipocitarios constituye un factor importante para el desarrollo de resistencia a insulina y síndrome metabólico. (Grundy, 2016).

En este sentido, la acumulación ectópica de lípidos, se ha asociado con la presencia de dislipidemias séricas, caracterizadas por un incremento de TAG, VLDL y LDL acompañados de una disminución de HDL, que son indicadores de síndrome metabólico de acuerdo a las guías de la ATP III (Grundy SM, 2005), estas dislipidemias son ocasionados por el incremento de ácidos grasos en hígado, donde con la finalidad de redistribuirlos a su lugar de predisposición, se estimula la producción de VLDL, la cual ocasionará el aumento de TAG circulantes (Erez F. Scapa, 2002), estos resultados concuerdan con los incrementos observados en nuestros animales tratados con SrB en VLDL, y LDL en relación a la administración crónica (60 días). No obstante, al realizar el análisis del corrimiento electroforético de estas lipoproteínas, si bien se presenta un incremento de VLDL, se observa también una disminución de LDL; recordando que la técnica permite separar a las lipoproteínas por tamaño, y observando su distribución, se puede interpretar que la curva que desciende desde el pico máximo de VLDL, hasta el punto mínimo de LDL, disminuye progresivamente, lo cual es fuertemente sugestivo de un proceso de deslipidación, es decir, aun cuando se encuentran incrementadas sus concentraciones séricas, el corrimiento electroforético nos permite evidenciar que cumplen con su función de distribuir TAG y CE (Colesterol esterificado) a los tejidos, y que no existe un incremento en las fracciones más aterogénicas LDL_{IVb} y HDL_{3c}.

Esta deslipidación de las lipoproteínas es regulada por la interacción de las apolipoproteínas B-100, entre las apo CII y apoE con la LPL presente en el endotelio

de los diferentes tejidos, proceso en cual se sabe que insulina juega un papel clave. Otro proceso importante que implica la función directa de insulina es la homeostasis de la glucosa, en este sentido se tienen numerosos reportes de la actividad hipoglucemiante de SrB. Los grupos de Sunanda y Shivana en 2013, describieron que en sus modelos diabéticos tratados con SrB, existió una disminución de la concentración sérica de glucosa en ayuno de hasta 226%, además los animales tratados tuvieron una mejor respuesta durante una TOG, tanto en administraciones agudas como crónicas (P.B. Jeppesen, 2000; Singh, 2014; Sunanda Singh, 2013; Shivanna N, 2013); mismo fenómeno que ocurrió en nuestro modelo experimental, en el cual los animales tratados con SrB, presentaron reducciones importantes en relación a la glicemia desde el primer mes, esto, a expensas de un súbito y muy importante incremento en la secreción de insulina como se observó en la respuesta insulínica de las TOG. Estos resultados se vuelven interesantes debido a que los estados hiperinsulinémicos, han sido fuertemente relacionados con el desarrollo de resistencia a insulina, al propiciar a una desensibilización tisular a la hormona por la constante exposición a la misma. (Shanik, 2008)

Las evidencias en general apuntan a páncreas como uno de los tejidos uno de los tejidos mayormente influenciados por el tratamiento con SrB. En este sentido, existen dos conductas primordiales a destacar, la primera, es la acumulación de TAG y glucógeno en el tejido, constituyendo factores de riesgo para el desarrollo de lipo y glucotoxicidad. La segunda es la respuesta antioxidante que posee el páncreas y que fue potenciada por SrB. Este tipo de estímulos, puede ocasionar la activación de vías de proliferación celular, o bien desencadenar procesos de muerte celular. En principio, ambas hipótesis podrían argumentar el incremento observado en relación a la secreción de insulina, sin embargo, solo la primera sería capaz de sostener la producción de la misma de manera crónica, por lo que ante el estímulo constante de SrB tanto para la síntesis como para la liberación de insulina, resulta indispensable poner en evidencia los procesos que tienen lugar en páncreas como parte de la respuesta adaptativa del mismo y que le permiten hasta este punto, responder a los requerimientos periféricos.

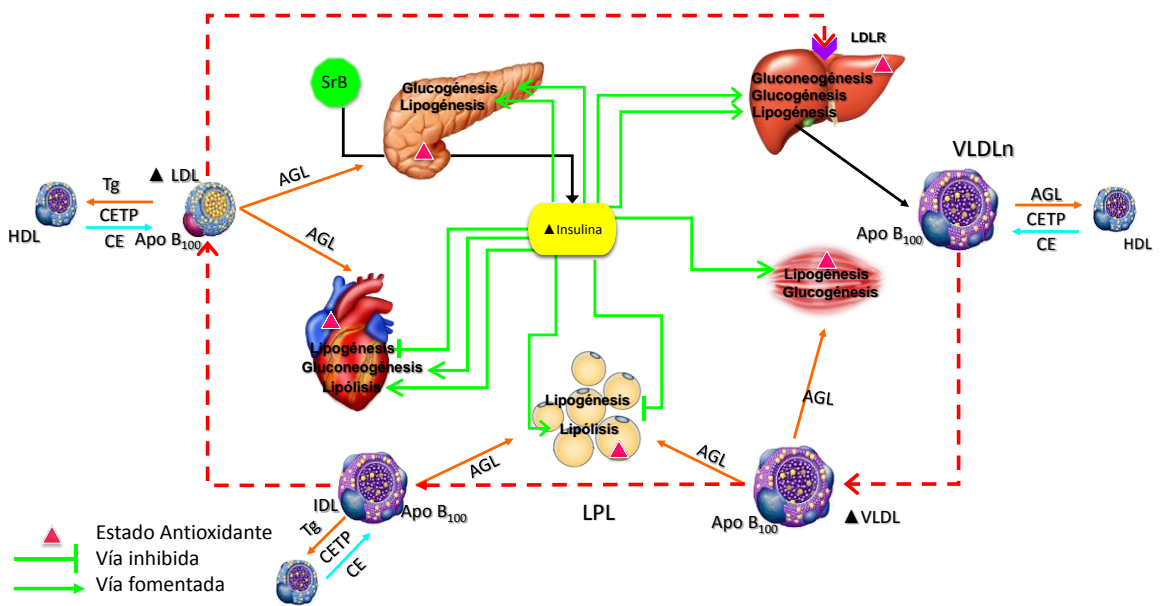
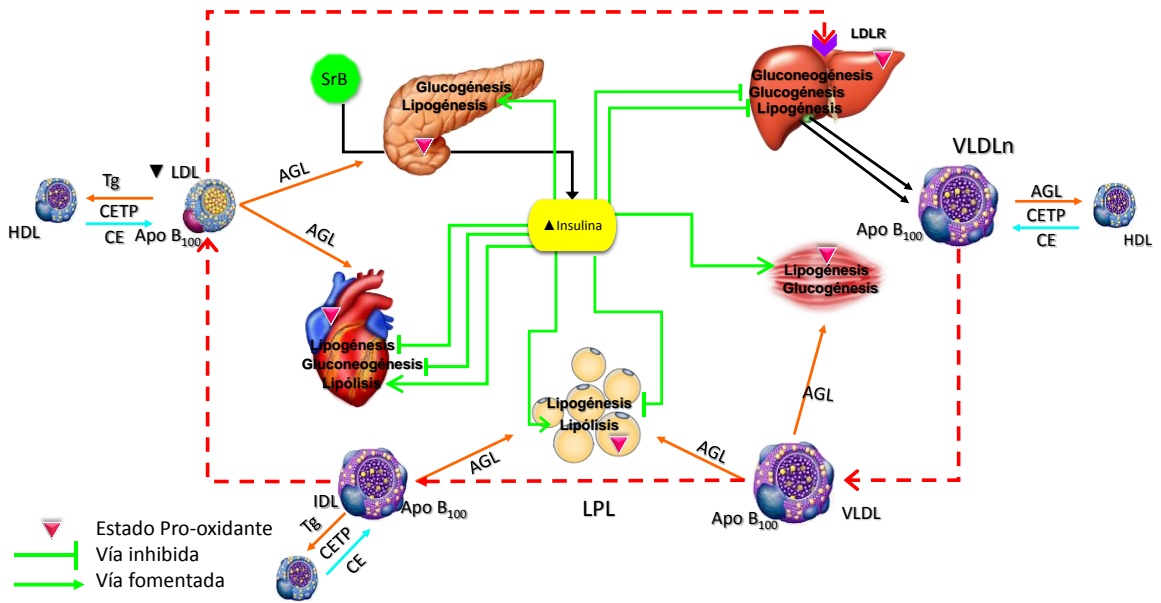


Figura 22. Efecto metabólico y antioxidante de SrB con dieta normocalórica a 30 días (arriba) y 60 días (abajo)

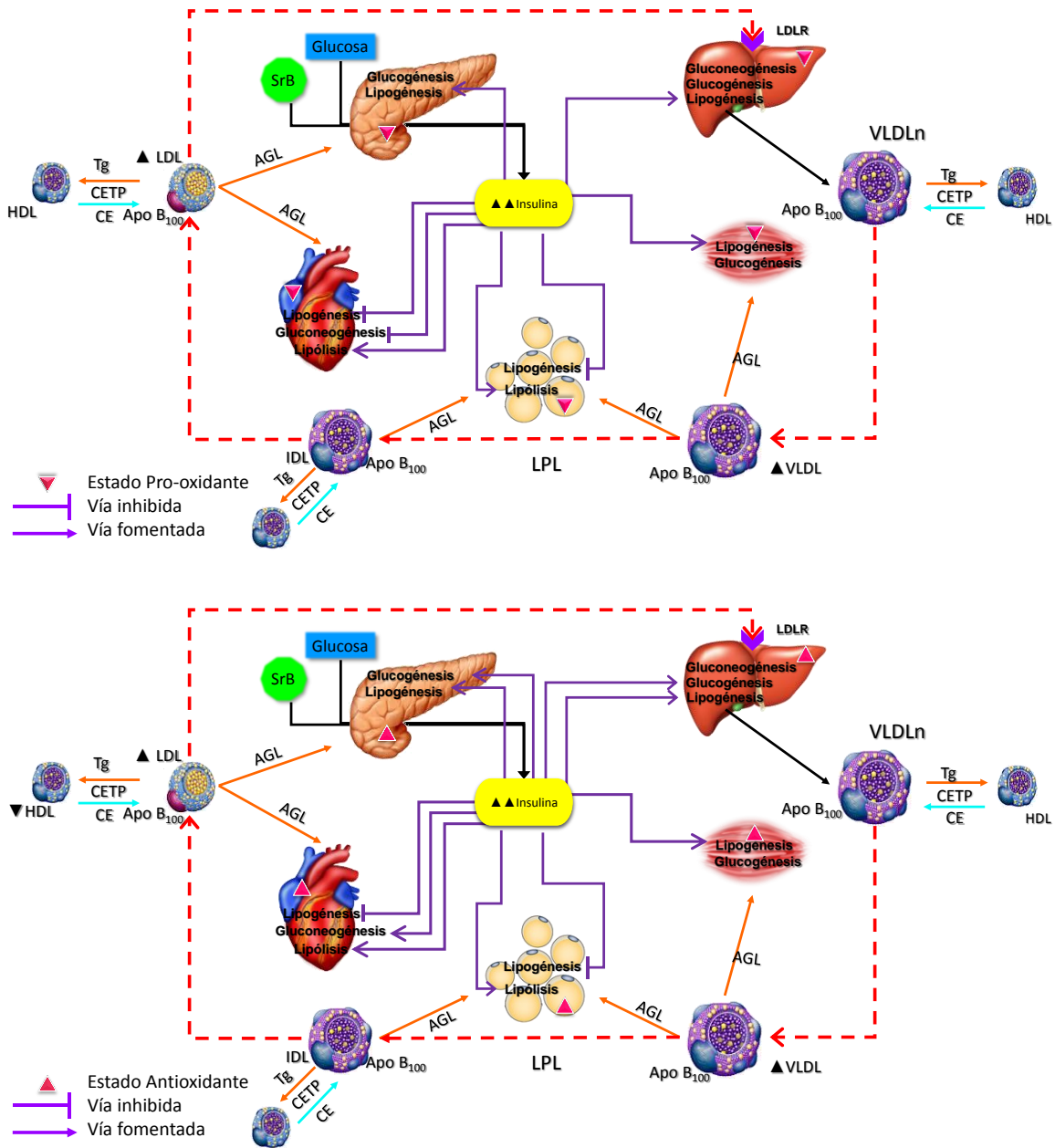


Figura 23. Efecto metabólico y antioxidante de SrB con dieta hiperglúcida-hipercalórica a 30 (arriba) y 60 días (abajo) de administración.

Efecto de SrB en la dinámica de expresión-secreción de insulina.

Para que se dé una adecuada producción y secreción de insulina, es necesario que el páncreas, y particularmente la célula β , se encuentren en condiciones óptimas, es decir, que tanto histológica como funcionalmente, sus características sean las

normales, en este sentido, se sabe que los islotes tienen formas en su mayoría esféricas u ovaladas, con un tamaño promedio de entre 100 y 500 μm , y un número variable de células por islote dependiendo del tamaño del mismo, se ha descrito también que puede existir la ligera presencia de adipocitos solitarios o en agregados usualmente alejados del concentrado de los islotes (Hib, 2001).

Anteriormente, se mencionó que insulina regula vías autócrinas en el islote a fin de promover la proliferación celular, Rachel Stamaters y colaboradores analizaron en 2016 la participación de mTOR, ciclina D2 y el IRS-2, en la estimulación hiperplásica mediada por la hiperglucemia tanto en ratones knock out a IRS-2 como en wild type, observando que la cascada de señalización de IRS-2 hacia PI3K y mTOR es necesaria para la expresión de ciclina D2 y que la participación de ésta es indispensable para la proliferación de células beta, (Rhodes CJ, 2013; Assmann A, 2009), así mismo, se sabe que particularmente el H_2O_2 producido en el tejido, participa activamente en la regulación inicial de vías proliferativas en el islote, mediante la activación de la vía MAPK/ERK 1/2, quien activa el complejo AP-1, el cual estimula la translocación nuclear de los factores de transcripción EGFR y CREB. (Asima Bhattacharyya, 2014; E Hoarau, 2014), de este modo los estímulos hiperplásicos observados en nuestros resultados pueden tener su explicación en estas vías, por otra parte, durante la vida adulta, el tamaño de la célula beta puede adaptarse en respuesta a un incremento en las demandas celulares, tal como sucede en el embarazo o ante la pérdida de sensibilidad a insulina en tejidos periféricos, lo que conlleva a un incremento en su tamaño, (Mathis D, 2001), esta característica hipertrófica, está dada por estímulos de glucosa, insulina y AGL principalmente, (Yoon Sin Oh, 2015) y también se ha visto influenciada por vías relacionadas con el péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1), (Vilsbøll, 2009), este efecto, se observó en los animales tratados con SrB y ambos tipos de dieta, con lo que podemos inferir que probablemente la regulación sea dada en el caso de SrB y dieta NC por insulina y el flujo de AGL, y particularmente en el caso de SrB con la dieta HC, por la acción conjunta de los tres inductores descritos por Yoon Sin Oh en 2015.

La proliferación de células β , está implícitamente vinculada a una tasa de secreción de insulina mayor; bajo condiciones fisiológicas normales, la célula beta, mantiene un balance entre la secreción, la producción y la degradación de insulina para mantener un óptimo almacenamiento intracelular de la hormona; cuando los niveles de glucosa y AGL incrementan, o la administración aguda de algún insulínico ejerce su acción, se estimula la liberación de insulina, y existe un incremento rápido y proporcional en la biosíntesis de proinsulina a nivel transcripcional que eficientemente restablece las reservas de ésta, no obstante, la exposición crónica tanto a potencializadores en la secreción de insulina, como a AGL, se ha demostrado que podría disminuir severamente las reservas de insulina, al no haber una compensación dada por estos ante la hipersecreción, (L. Cornelius Bollheimer, 1998)

En este contexto, basalmente, se observó un incremento en la producción de insulina en los grupos tratados con SrB, esto habla de mayores reservas de insulina en la célula β , como parte de una respuesta adaptativa de la misma, al pensar que SrB estimula grandes secreciones de la hormona, tal como se observó en la parte sérica; por otro lado, ante el estímulo dado por la TOG. Si bien SrB ejerce un estímulo en la producción de insulina, glucosa es el efector principal para promover la biosíntesis de proinsulina e incrementar en gran manera las reservas de la hormona a modo de estar completamente capacitado para responder ante las necesidades del sistema, que implican secreciones aún mayores durante el post-prandio.

La regulación de estas vías mediante glucosa, está mediada por MTF-1 (Factor de transcripción a metales tipo 1), PDX-1 (Homeobox pancreático y duodenal), NeuroD1 y MafA (Oncogen de fibrosarcoma musculoaponeurítico homólogo de A), de este modo, la disminución observada en la expresión basal de PDX-1 en su tratamiento a 30 días con SrB, sugiere fuertemente otras vías de inducción, de las cuales la asociada a MafA podría ser la que regule dicha expresión. La expresión de este factor de transcripción se delega a células productoras de insulina, tanto en páncreas en desarrollo como en el adulto, confiriendo una mayor capacidad de respuesta a la glucosa con un incremento en la secreción de insulina, además de incrementar el porcentaje de células secretoras de la hormona (Aguayo-Mazzucato, 2011). Ahora bien, tanto en el

post-prandio de la administración a 30 días, como en el ayuno de la administración a 60 días de SrB, se observa claramente, que el edulcorante y en menor proporción glucosa estimulan positivamente la síntesis de insulina teniendo como efector principal al factor de transcripción PDX-1; se sabe que dentro de su estructura, PDX-1 contiene 283 a.a., y se han descrito diversos dominios funcionales; de este modo, se distingue un homodominio involucrado en la unión al DNA y la interacción proteína-proteína, flanqueado por dos zonas ricas en prolina; un dominio altamente conservado en residuos de histidina y un dominio de transactivación localizado dentro de la región amino terminal que puede ser subdividida en tres subdominios con funciones diferentes, esto le permite regular simultáneamente genes involucrados en la transcripción de GLUT-2, GK y el polipéptido amiloide del islote. Esta capacidad para activar la transcripción de genes, depende también de su capacidad para interactuar con otros factores de transcripción, tal es el caso de NeuroD1, cuyo sinergismo permite la activación del promotor del gen de insulina (C. M. McKinnon, 2001). Por otro lado, las condiciones en el postprandio de una administración crónica, hacen alusión a una regulación dada por glucosa, en la que MafA ejerce primordialmente el efecto, desplazando en este momento, la acción de PDX-1 tal como lo demostró Mazzucato en 2011 (Aguayo-Mazzucato, 2011).

Así mismo, una mayor producción de insulina requerirá de sitios de almacenamiento en la célula, por lo que fue necesario evaluar las características generales de los gránulos de insulina, estos son orgánulos intracelulares complejos, compuestos de muchas proteínas con diferentes actividades catalíticas y de señalización, con la capacidad de fusionarse o sintetizarse en pro de las demandas celulares tal como lo reportó Schumacher en 2015; durante su estudio, observó que la glucosa y los estímulos directos de bloqueo al canal de potasio, si bien disminuyen el número de gránulos preexistentes en la célula por efecto de la secreción de insulina, incrementan la llegada de más gránulos y en el caso de los inhibidores del canal de K^+ , incrementan en mayor proporción que glucosa, la fusión en los gránulos tanto preexistentes como de llegada, (Schumacher, 2015).

Previamente Brunner en 2007, había realizado un análisis proteómico para conocer los tipos de proteínas presentes en los gránulos secretorios, clasificándolos en cuatro clases estructurales: proteínas de membrana como Rab, Granulofilina, VAMPs y Lamp2, nuevas proteínas sin función biológica asignada, otras proteínas que incluye a la fructosa bifosfato aldolasa A o la pepetidil prolil cis-trans isomerasa A, y proteínas vesiculares, destacando a insulina, cromogranina A, betagranina y secretogranina, (Yannick Brunner, 2007). La Cromogranina A es una glicoproteína ácida que se localiza de manera ubicua en los gránulos secretorios de células endócrinas y neuroendócrinas, sus péptidos derivados (betagranina y pancrastatina) se han asociado con la maduración y liberación de insulina (Gerhard M. Schmid, 2007), y es la mayor proteína co-secretada junto con la insulina; por lo anteriormente descrito, la relación entre la cantidad de insulina y cromogranina presentes en el tejido, son indicativos de los procesos de fusión y multiplicación de gránulos de insulina. De esta manera, al observar los resultados de los animales tratados con SrB, se puede inferir que en el estado de ayuno, la disminución en la concentración de cromogranina puede ser indicativo de fusión en los gránulos, mientras que en el proceso del post-prandio, el incremento de cromogranina se relaciona con un mayor número de gránulos, estos resultados concuerdan con los procesos de fusión y multiplicación de gránulos descritos por Schumacher en 2015 (Schumacher, 2015).

Una vez constatada la acción de SrB en la producción de insulina, los efectores de su regulación y las características de su almacenaje, fue importante conocer y establecer las vías por las cuales ejerce su efecto insulino-trópico. Respecto a esto, anteriormente se pensaba que SrB ocasionaba un bloqueo al canal de potasio tal como lo hacen las sulfonilureas, y que este bloqueo llevaba a la secreción de insulina mediante la vía canónica. Sin embargo, en el año 2000 durante los estudios que Jeppesen y colaboradores realizaron, se demostró que SrB estimulaba la secreción de insulina en dosis de glucosa desde 8.3 hasta 16.7 mmol/L, lo que descartó la influencia de glucosa en esta vía; además, observaron que la secreción de insulina se daba incluso en ausencia de calcio extracelular, y que no existía un efecto inhibitorio en el canal de K, ni de estimulación para la producción de AMPc, con lo que la creencia tanto de un mecanismo de acción similar al de las sulfonilureas o mediado por la vía clásica, fue

descartado, sustituyendo esto por términos como una acción directa sobre la célula β pancreática, no obstante la vía sigue sin esclarecerse, y los demás autores que refieren el término insulino-trópico, únicamente demuestran los incrementos en las concentraciones séricas de insulina, (Chen J, 2006; Jeppesen P, 2000; P. B. Jeppesen, 2002; P.B. Jeppesen, 2000; Singh, 2014).

Se sabe, que la liberación de insulina, sigue un proceso finamente regulado, que involucra múltiples vías e inductores, al intentar investigar el posible mecanismo de SrB como insulino-trópico, se tuvieron en cuenta las similitudes entre los hallazgos presentes en el modelo, y las características de cada vía no canónica, de todas ellas, destacan dos principalmente, la que está dada por regulaciones entre p38 δ y PKD-1 y la modulada por los receptores estrogénicos. La vía correspondiente a p38 δ y PKD-1 fue estudiada por Sumara y colaboradores en 2009, en un modelo knock-out a p38 δ , se demostró que la ablación de p38 δ activa PKD1, y por lo tanto aumenta la secreción de insulina y mejora la tolerancia a la glucosa. Además, se mostró que el carbacol, un análogo de la acetilcolina (ACh) activa fuertemente PKD1 en las células β pancreáticas. Esta función fisiológica de PKD1 puede ser completamente bloqueada por un aumento de la actividad p38 δ . La ACh representa el principal neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático periférico, y su unión a los receptores muscarínicos de acetilcolina situados en las células β pancreáticas potencia la secreción de insulina (Gautam, 2006). Los receptores muscarínicos pertenecen a los receptores acoplados a proteínas Gq (Proteína G que activa a PLC) que estimulan a PLC (Fosfolipasa C) a producir inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y DAG, este último activa numerosos miembros de la familia de PKC, incluyendo PKD (Oancea, 2003)

Es importante destacar que la disminución de PKD-1 también bloquea la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. En las células β carentes de p38 δ , se potencia la actividad constitutiva de PKD-1, y un aumento dos veces mayor en la actividad de PKD fue visto en estimulación de glucosa. Se ha informado de que la glucosa genera DAG en las células β (Peter-Riesch, 1988). Esto puede ocurrir ya sea por un efecto

directo del metabolismo de la glucosa o ser secundaria a los aumentos de glucosa inducida en activación dada por PLC (Thore, 2007) .

Ante la administración de SrB, se observó una marcada disminución de p38 δ , con lo que la actividad de PKD-1, como efector del incremento en la secreción de insulina fue posible. En conjunto, estos datos apoyan un papel clave de la vía p38 δ -PKD-1 en la secreción de insulina mediada por SrB, esta señalización, al ser independiente del metabolismo de glucosa, los influjos cálcicos, el bloqueo del canal de K_{ATP}, y ser estimulada por el estrés oxidativo (Storz, 2003), presenta una gran homología entre lo previamente descrito para SrB, y los hallazgos encontrados en el modelo actual; planteándolo como una opción fuertemente ligada al probable mecanismo de acción para SrB.

Otra vía emergente, e interesante para estos fines, es la que está dada por los receptores de estrógenos. Se ha reportado, que la administración crónica de estas moléculas a ratas diabéticas por pancreatectomía parcial o administración de aloxano, mejora a DM2, ocasiona hipertrofia en los islotes e incrementa el contenido y la secreción de insulina pancreática (Cstrini, 1971; Choi, 2005), al igual que sucede en cultivos celulares. Este efecto, mediado por estradiol, y estudiado en diferentes tipos de insulinomas, incrementa además la actividad de la glucocinasa en una relación tiempo y dosis dependiente, y de este modo aumenta la liberación de insulina, mediada por glucosa (Magnaterra, 1997), esta liberación está dada por una depolarización en la célula, seguida de un influjo cálcico que conlleva a la liberación de insulina. Por lo tanto, el estradiol tiene la capacidad de influenciar a la célula β en respuesta a otros estímulos y no solo a glucosa (Al-Majed, 2005).

El efecto del estradiol está dado por la interacción con su receptor; en el caso de la síntesis de insulina mediada por RE α , quien río abajo en la señalización destaca la activación de Src y ERK (Señal extracelular regulada por cinasas); de este modo, se potencializa la translocación nuclear y unión del factor de transcripción NeuroD1 al promotor del gen de insulina (Wong, 2010). Caso contrario a lo que ocurre en la

estimulación de la secreción de insulina, en la cual interfiere el RE β , reduciendo la actividad del canal de K_{ATP} e induciendo el flujo de Ca²⁺ para la liberación de insulina (Tiano, 2012).

Debido a este paradigma de acciones y señalización, se analizó en 2013, la capacidad insulínica de algunos agonistas selectivos del RE β , como WAY200070, encontrándose un incremento en la concentración de insulina tanto en suero como en el islote de los animales tratados, se observó además una mejora en las concentraciones séricas de glucosa y un incremento en la proliferación y el tamaño de la célula β , (Alonso-Magdalena, 2013). Por otro lado, para evaluar la probabilidad de estas interacciones entre el RE con sus agonistas, se han realizado análisis de modelamiento molecular (Molecular Docking), para ello se cuantificó la energía de afinidad de diferentes derivados del 17- β -estradiol, (Wang P, 2013), y los principales a.a. involucrados en la interacción. El análisis realizado en el presente trabajo de la interacción entre el RE β y el ligando de referencia (AOE) mostró una energía de afinidad de -10.1 Kcal/mol, mientras que la interacción con el estradiol fue de -11.0 Kcal/mol, y la del Steviol -8.2 Kcal/mol, en el caso de los primeros dos, las interacciones con el receptor fueron tanto hidrofóbicas como por puente de hidrógeno, en el caso del Steviol, únicamente hidrofóbicas. Adicionalmente se pudo observar que, los a.a. involucrados principalmente fueron M291, L294, L432, E260, R301, F311, L253, M250, L430, I328, I331, de los cuales, L294, R301, F311, L253, M250 e I331, coinciden con lo reportado en el estudio de Wang en 2013, así como las energías de afinidad que van desde -12.82 hasta -25 Kcal/mol. De tal modo se puede deducir que, tomando en cuenta la energía presentada por el Steviol, se considera que existe la posibilidad de que esta molécula presente una alta afinidad por el RE- β , sin embargo, para conocer su especificidad se requieren estudios más especializados. Este comportamiento insulínico en el modelo *in vivo*, es probable, toda vez que las concentraciones tanto de estradiol como de testosterona se mantuvieron sin variaciones en los animales tratados con SrB, descartando la influencia de éstos en la activación de las vías promotoras de secreción de insulina.

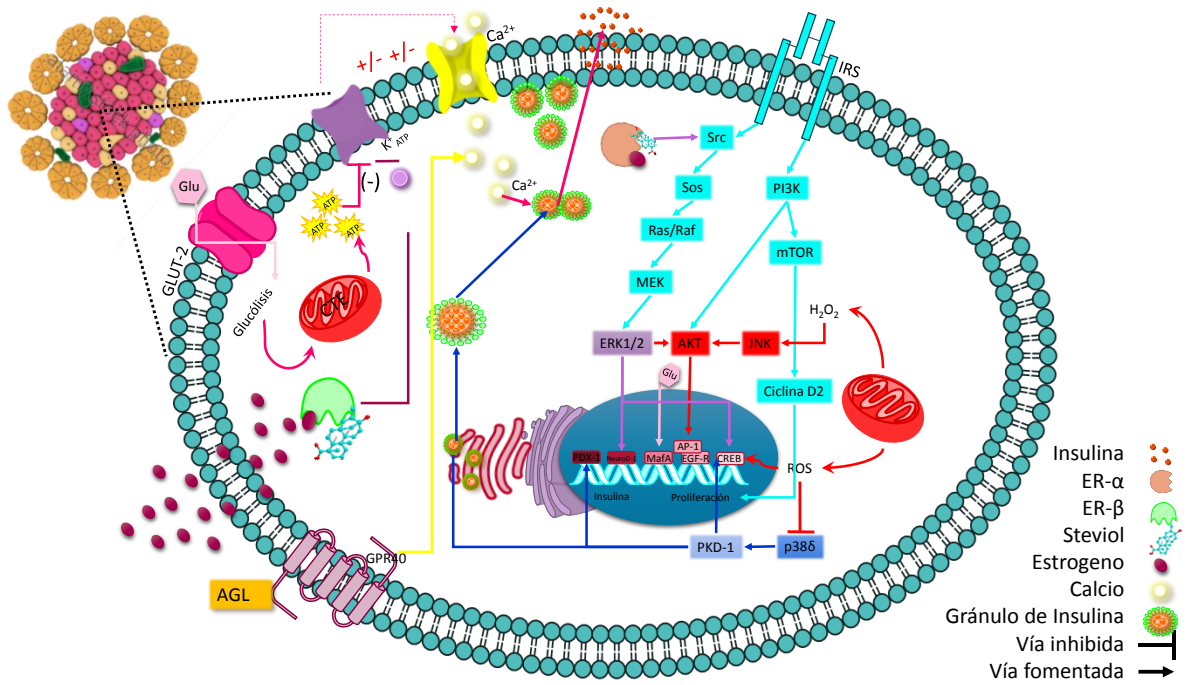


Figura 24. SrB como modulador de vías no canónicas de secreción de insulina en condiciones normo e hipercalóricas.

11. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo el objetivo general fue conocer y entender el (los) efecto(s) por el cual(es) el edulcorante natural cuyos índices de consumo como suplemento de azúcares de uso común van en aumento, *Stevia rebaudiana* Bertoni (SrB) actúa como insulinoatrópico y cómo ésta influencia el metabolismo de carbohidratos y lípidos en un modelo animal con ratas Wistar expuestas a dieta normo e hipercalórica. Tomados en conjunto los resultados, estos muestran que SrB es un potente insulinoatrópico tanto en consumos normocalóricos como hipercalóricos, asociados al ayuno y al postprandio.

Por lo que se puede concluir que la hiperinsulinemia generada por el consumo de SrB influye positivamente en los niveles de glucosa y lípidos en circulación, pero promueve en el consumo crónico desregulaciones metabólicas en diferentes tejidos, cambiando la dinámica de sustrato energético tisular, y llevando a desarrollo de lipo y glucotoxicosis, lo que conlleva a un incremento en la producción de ROS, asociadas a vías de adaptación, proliferación y muerte celular.

El tejido de afección por el consumo de SrB fue páncreas, en donde se estimularon vías de proliferación, y una mayor síntesis de insulina, a través de la actividad de factores de transcripción como PDX, y señalizaciones mediadas por ROS, lo cual fue corroborado por la dinámica de las MAPK.

La actividad insulinoatrópica de SrB se debe a procesos de fisión de gránulos de insulina, los cuales presentaron una dualidad en relación al ayuno, al estímulo secretorio de rutas no canónicas asociadas p38 δ /PKD-1 y a receptores estrogénicos, logrando identificar la participación clave de estas moléculas como efectores de la liberación de insulina dada por SrB, sin embargo, se necesitan estudios más profundos para esclarecer esta nueva teoría.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani, M. D. (2016). Prediabetes and risk of diabetes and associated complications: impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance: does it matter? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6.
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzimology*, 121-126.
- Aguayo-Mazzucato, C. A.-C.-W. (2011). Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*, 54(3), 583-693.
- Al-Majed, H. T. (2005). Effect of 17beta-estradiol on insulin secretion and cytosolic calcium in Min6 mouse insulinoma cells and human islets of Langerhans. *Pancreas*, 30, 307-313.
- Alonso-Magdalena P, R. A. (2008). Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *Plos One*, 3(4), e2069.
- Alonso-Magdalena, P. A.-A.-A. (2013). Antidiabetic Actions of an Estrogen Receptor beta Selective Agonist. *Diabetes*, 62, 2015-2025.
- Asima Bhattacharyya, R. C. (2014). Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*, 94(2), 329-354.
- Assmann A, U. K. (2009). Glucose Effects on Beta-Cell Growth and Survival Require Activation of Insulin Receptors and Insulin Receptor Substrate 2. *Mol Cell Biol*, 29(11), 3219-3228.
- B Geeraert, F. C. (2010). Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice. *International Journal of Obesity*, 569-577.
- Bansal, N. K. (2014). *Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation*. India: Springer.
- Beckerman, M. (2009). *Cellular Signaling in Health and Disease, biological and medical physics, biomedical engineering*. New York: Springer.
- Birben E, S. U. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(9), 9-19.

- Brandle J, T. P. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68, 1855-1863.
- C. M. McKinnon, K. D. (2001). Pancreatic duodenal homeobox PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*, 44, 1203-1214.
- Chao C, H. S. (1992). Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *Journal Of Immunology*, 149(8), 2736-2741.
- Chen J, J. P. (2006). Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or β -cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: Studies in vitro. *Life Sciences*, 78, 1748-1753.
- Choi, S. B. (2005). Estrogen and exercise may enhance beta cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology*, 146, 4786-4794.
- Cofepris. (2012). *Diario Oficial de la Federación*. Obtenido de Diario Oficial de la Federación: http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5259470 [Accessed 12 January 2016].
- Cstrini, N. V. (1971). Relative effects of pregnancy, estradiol, and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion. *J. Clin. Invest.*, 50, 992-999.
- Curi R, A. M. (1986). Effect of Stevia rebaudiana on glucose tolerance in normal adult humans. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 19(6), 771-774.
- Cynthia A. Nagle, E. L. (2009). Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *Journal of Lipid Research*, 50, S74-S79.
- DeFronzo R, F. E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14(3), 173-194.
- Dimitriadisa, E. a. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes research and clinical practice*, 93, 52-59.
- E Hoarau, V. C. (2014). Pro-oxidant/antioxidant balance controls pancreatic β -cell differentiation through the ERK1/2 pathway. *Cell Death and Disease*, 5, 1487.
- Egger G, S. B. (1997). An "ecological" approach to the obesity epidemic. *BMJ*, 315(477), 80.

- ENSANUT, S. d. (2012). *Encuesta Nacional de Salud, Resultados Nacionales*. México DF: Instituto Nacional de Salud.
- Erez F. Scapa, K. K. (2002). Lipoprotein Metabolism, Functions on the Liver. *Metabolism*.
- Facchini F, C. Y. (1991). Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake, urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration. *JAMA, The Journal Of The American Medical Association*, 21(3008).
- FDA. (2014). *Food and Drug Administration Protecting and Promoting Your Health*. Obtenido de Food and Drug Administration Protecting and Promoting Your Health:
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397716.htm>
- Francesca Bonomini, L. F. (2015). Síndrome metabólico, envejecimiento y la implicación del estrés oxidativo. *Envejecimiento y la enfermedad*, 6(2), 109-120.
- Gerhard M. Schmid, P. M.-C. (2007). Inhibition of Insulin Secretion by Betagranin, an N-terminal Chromogranin A Fragment. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 12717-12724.
- Goldberg, I. J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoproteins metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research Volume*, 37.
- Griffith, O. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.*, 106(1), 7-12.
- Grundy SM, C. J. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement Circulation. *American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute*, 112, 2735-2752.
- Grundy, S. M. (2016). Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. *J Invest Med*, 64, 1082-1086.
- Hib, J. (2001). *Histología de Di Fiore*. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo.
- I.Kruk. (1998). *The Handbook of Environmental Chemistry*. New York: Springer.

- IFICF, I. F. (2012). *Food insight*. Obtenido de Food insight: http://www.foodinsight.org/2012_Food_Health_Survey_Consumer_Attitudes_toward_Food_Safety_Nutrition_and_Health
- Il-Suk Kim, M. Y.-H.-N. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana*. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 1328-1332.
- Islam, M. S. (2015). *Islets of Langerhans*. London: Springer.
- Jayaraman S, M. M. (s.f.). In-vitro Antimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia Rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts. . *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, *7*(4), 1143-1149.
- Jeppesen P, G. S. (2000). Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism Clinical and Experimental*, *49*(2), 208-214.
- Jose Caruci, N. C. (2006). *Nutrición y Salud*. Nashville EUA: Caribe Inc.
- Joseph, H. W. (1999). Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine*, *27*(5-6), 612-616.
- Kim, J. C. (2012). *Stevia, the genus Stevia. Medicinal and aromatic plants—industrial profiles*. A. D. Kinghorn .
- L. Cornelius Bollheimer, R. H. (1998). Chronic Exposure to Free Fatty Acid Reduces Pancreatic b Cell Insulin Content by Increasing Basal Insulin Secretion That Is Not Compensated For by a Corresponding Increase in Proinsulin Biosynthesis Translation. *J Clin Invest*, *101*(5), 1094-1101.
- L. W. Bennett, R. W. (2007). Methodologies of Tissue Preservation and Analysis of the Glycogen Content of the Broiler Chick Liver. *Poultry Science*, *86*, 2653–2665.
- Lang, T. (2009). Reshaping the food system for ecological public health. *Journal of hunger and enviromental nutrition*, *4*(3), 315-335.
- Lang, T. a. (2007). Overcoming policy cacophony on obesity: An ecological public health framework for policy-markers. *Obesity reviews*, *8*(1), 165-181.

- Magnaterra, R. e. (1997). The effects of pregnancy steroids on adaptation of beta cells to pregnancy involve the pancreatic glucose sensor glucokinase. *J. Endocrinol.*, 155, 247-253.
- Mathis D, V. L. (2001). Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414, 792–798.
- Mauvais-Jarvis, J. P. (2012). Importance of oestrogen receptors to preserve functional beta-cell mass in diabetes. *Nat. Rev. Endocrinology*, 8, 342-351.
- Michael B. Stout, T. T. (2007). The Aging Adipose Organ: Lipid Redistribution, Inflammation, and cellular senescence. En G. F. Braunschweig, *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease* (págs. 69-80). Human Press: New York.
- Mickey Chopra, S. G.-H. (2002). A global response to a global problem: the epidemic. *Bulletin of the World Health Organization*, 80(12), 952-958.
- Nebreda, A. C. (2009). p38 δ and PKD1: Kinase Switches for Insulin. *Cell*, 136, 209-210.
- OMS. (2004). *Estrategia mundial sobre régimen alimenticio, actividad física y salud*. Ginebra, Suiza: OMS.
- OMS. (2005). *WHO Child Growth Standards*. OMS.
- OMS. (Enero de 2015). *Organizacion Mundial de la Salud*. Obtenido de Organizacion Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- OMS. (2015). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/topics/nutrition/es/>
- P. B. Jeppesen, S. G. (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic, and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*, 9, 9-14.
- P.B. Jeppesen, S. G. (2000). Stevioside Acts Directly on Pancreatic β Cells to Secrete Insulin: Actions Independent of Cyclic Adenosine Monophosphate and Adenosine Triphosphate-Sensitive K⁺-Channel Activity. *Metabolism*, 49(2), 208-214.
- Panten U, S. M. (1996). Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 104(1), 1-9.

- Paul Holvoet, A. R.-H.-S. (2014). Stevia-derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 22-33.
- Pi J, Z. Q. (2010). ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. Toxicology And Applied ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 244.
- Reziwanggu Abudula, P. B. (2004). Rebaudioside A Potently Stimulates Insulin Secretion From Isolated Mouse. *Metabolism*, 53(10), 1378-1381.
- Rhodes CJ, W. M. (2013). Direct Autocrine Action of Insulin on β -Cells: Does It Make Physiological Sense? *Diabetes*, 62(7), 2157-2163.
- Risco, A. C. (2012). New insights into the p38 γ and p38 δ MAPK pathways. *Journal of Signal Transduction*, 1-8.
- Roxana Carbó, V. G. (2002). Cambios en el metabolismo cardiaco y su posible aprovechamiento en la terapéutica. *Archivos de Cardiología de México*, 218-229.
- Ruiz Ruiz JC, M. O. (2014). Antioxidant capacity of leaf extracts from two Stevia rebaudiana Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), 1163-1170.
- Sarmiento-Ortega, V. E. (2014). *El meta-vanadato de sodio como regulador del metabolismo de carbohidratos y lípidos en ratas con dos modelos de síndrome metabólico inducido*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Schumacher, K. M. (2015). Granule Mobility, Fusion Frequency and Insulin Secretion Are Differentially Affected by Insulinotropic Stimuli. *Traffic*, 16, 493-509.
- Seino S, B. G. (2008). *Pancreatic beta cell in health and disease*. Japón: Springer.
- Sharma R, Y. R. (2012). Original article: Study of effect of Stevia rebaudiana bertoni on oxidative stress in type-2 diabetic rat models. *Biomedicine & Aging Pathology*, 2, 126-131.
- Shigetada Furukawa, T. F. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752-1761.
- Shivanna N, N. M. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. *Journal Of Diabetes And Its Complications*, 27, 103-113.

- Shulman, V. T. (2012). Integrating Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, 148(5), 852-871.
- Singh, V. G. (2014). Antidiabetic, Antydislipidemic and Antioxidative potential of methanolic root extract of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) on alloxan induced diabetic mice. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(7), 1859-1872.
- Soejarto D, K. A. (1982). Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *Journal Of Natural Products*, 45(5), 590-599.
- Soloni F, S. L. (1973). Colorimetric microdetermination of free fatty acids. *Clinical Chemistry*, 19(4), 419-424.
- Sumara G, F. I. (2009). Regulation of PKD by the MAPK p38 δ in Insulin Secretion and Glucose Homeostasis. *Cell*, 136, 235-248.
- Sumit G, E. S. (2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *International Journal Of Integrative Biology*, 1, 27.
- Sun Ha Jee, H. J. (2005). Obesity, Insulin Resistance and Cancer Risk. *Yonsei Medical Journal*, 46(4), 449-455.
- Sunanda Singh, V. G. (2013). ANTIHYPERGLYCEMIC AND ANTIOXIDATIVE ABILITY OF STEVIA REBAUDIANA (BERTONI). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 297-302.
- Tiano J, M.-J. F. (2012). Importance of oestrogen receptors to preserve functional [beta]-cell mass in diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 6, 342.
- Tiano, J. a.-J. (2012). Importance of oestrogen receptors to preserve functional beta-cell mass in diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 8, 342-351.
- Tomita T, S. N. (1997). Bactericidal Activity of a Fermented Hot-Water Extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Other Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Microbiology and Immunology*, 41(12), 1005-1009.
- Treviño, S. E.-L.-O.-L.-H.-B.-C.-V. (2015). Hypoglycemic, lipid-lowering and metabolic regulation activities of metforminium decavanadate (H₂Metf)₃ [V₁₀O₂₈].8H₂O

- using hypercaloric-induced carbohydrate and lipid deregulation in Wistar rats as biological model. *Journal of biological chemistry*, 147, 85-92.
- Vilsbøll, T. (2009). The effects of glucagon-like peptide-1 on the beta cell. *Diabetes Obes Metab*, 11(3), 11-18.
- Wang P, M. C. (2013). Structural Characterization of the Binding Interactions of Various Endogenous Estrogen Metabolites with Human Estrogen Receptor α and β Subtypes: A Molecular Modeling Study. *PLoS ONE*, 8(9), e747615.
- Warnick GR, M. J. (2006). Polyacrylamide gradient gel electrophoresis of lipoprotein subclasses. *Clinics in Laboratory Medicine*, 803-846.
- Wheeler A, B. A. (2008). Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food And Chemical Toxicology*, 46, S54-S60.
- Wiggins, S. K. (2014). Future diets: Under- and over-nutrition in developing countries. *Commonwealth Health Partnerships*, 32-36.
- William C. Stanley, F. A. (2004). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiology Review*, 85, 1093-1129.
- Wong, W. P. (2010). Extranuclear estrogen receptor- α stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci*, 107, 13057-13062.
- Yannick Brunner, Y. C.-C. (2007). Proteomics Analysis of Insulin Secretory Granules. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 1007-1017.
- Yoon Sin Oh. (2015). Mechanistic insights into pancreatic beta-cell mass regulation by glucose and free fatty acids. *Anatomy & Cell Biology*, 48(1), 16-24.
- Young Lee, H. H. (1994). Beta-Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: Impairment in adipocyte- beta-cell relationships. *Medical Sciences*, 91, 10878-10882.
- Zollner, H. E. (1989). Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med.*, 7(2), 197-203.

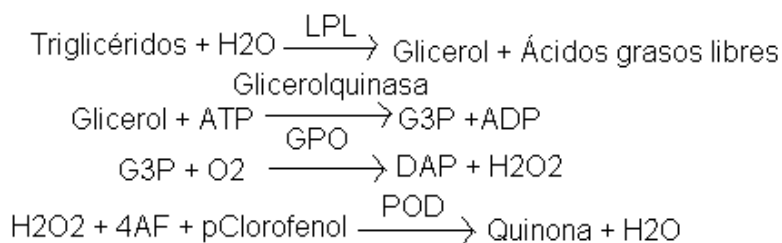
13. ANEXOS

ANEXO #1

Determinación de la concentración de triglicéridos.

FUNDAMENTO

La concentración sérica de triglicéridos, se realiza por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es mediada a una longitud de onda de 505 nm.



MÉTODO (Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

1. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

2. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.
3. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

CALCULOS

La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula.

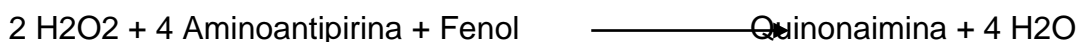
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

ANEXO #2

Determinación de la concentración de glucosa sérica

Fundamento

La glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



Método (Glucosa Oxidasa/Peroxidasa)

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 hrs.

Cálculos

La concentración de glucosa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula.

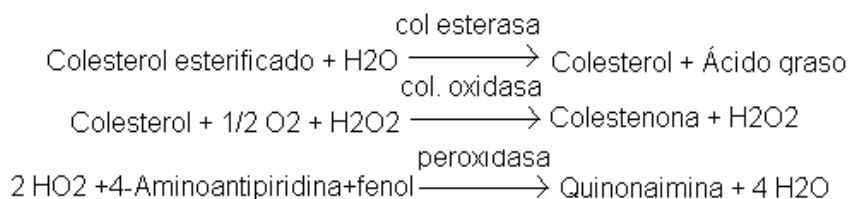
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

ANEXO #3

Determinación de Colesterol LDL reactivo precipitante

Fundamento

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil. La concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y el sobrenadante obtenido tras la precipitación. El colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación



1.- Pipetear en un tubo

Muestra 0.4ml

Reactivo 0.2 ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	20 µL		
Patrón Colesterol (S)		20 µL	
Sobrenadante Muestra			20 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

Cálculos

La concentración de colesterol en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente fórmula.

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor de dilución de muestra} = C \text{ Sobrenadante}$$

La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula

$$\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - \text{colesterol en sobrenadante}$$

ANEXO #4

Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante

El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones es hidrolizado por una colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. El detergente presente en el reactivo solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra. El colesterol de HDL se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación. El colesterol esterificado se hidrata mediante una colesterol esteras, dando como resultado colesterol y ácidos grasos libres, el colesterol resultante sufre una semioxidación e hidratación por una colesterol oxidasa, dando como resultado colesteno y peróxido de hidrógeno, este se acopla a una reacción coordinada por una peroxidasa con 4-aminoantipirina y una solución buffer DSBmT obteniéndose como producto final quinonaimina, que presenta color y este es detectado por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm.

Método: Precipitación

1.- Pipetear en un tubo

Muestra	0.2 ml
Reactivo (Col HDL)	0.5 ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	100 µL		
Patrón Colesterol HDL (S)		100 µL	
Sobrenadante Muestra			100 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 30 min. a temperatura ambiente o durante 10 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

Cálculos

La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula.

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor de dilución de muestra} = C \text{ Muestra}$$

ANEXO #5

Determinación de fructosamina

Fundamento: Las proteínas glicadas séricas reducen a las sales de tetrazolio (NBT) en medio alcalino. La velocidad de formación del formazán a una temperatura determinada es proporcional a la concentración sérica de proteínas glicadas.

Reactivos

Reactivo A: Está listo para su uso.

Patrón S: Reconstituir con 1,00 mL de agua destilada. Agitar suavemente y dejar reposar 30 minutos antes de utilizar. La solución es estable durante 15 días a 2-8°C, si se evita la contaminación durante su uso, o durante 45 días a -20°C congelado en alícuotas.

Muestras

Suero recogido mediante procedimientos estándar. Las muestras no deben presentar hemólisis.

La fructosamina en suero es estable 7 días a 2-8°C.

Procedimiento

1. Atemperar el Reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetear en tubos de ensayo:

	Muestra	Patrón
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL
Muestra	50 µL	---
Patrón (B)	---	50 µL

3. Mezclar bien e incubar inmediatamente a 37°C. Poner en marcha el cronómetro
4. Leer la absorbancia (A) de la muestra y el patrón a 530 nm exactamente a los 10 minutos (A₁) y a los 15 minutos (A₂) de incubación, frente a agua destilada.

Cálculos

La concentración de fructosamina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{(A_2 - A_1) \text{ Muestra}}{(A_2 - A_1) \text{ Patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

ANEXO #6

Determinación sérica de estradiol E2

Fundamento:

El E2 está basado en el principio de adherencia competitiva entre E2 en el espécimen de prueba y el conjugado de E2–HRP para una cantidad constante de anti-estradiol de conejo. En la incubación, los pozos revestidos de IgG anti-conejo de cabra son incubados con 25µl de estándares de E2, controles, y muestras de paciente, 100µL de Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP y 50 µL de reactivo anti-Estradiol de conejo a 37°C por 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fijada de E2 etiquetado de HRP compite con el E2 endógeno en el estándar, muestra, o suero de control de calidad para un número fijo de sitios de adherencia del anticuerpo de E2 específico. Así, la cantidad de conjugado de peroxidasa de E2 inmunológicamente adherida al pozo disminuye progresivamente conforme la concentración de E2 en el espécimen aumenta.

El conjugado de peroxidasa de E2 no adherido es después removido y los pozos son lavados. Después, una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de 1N HCl, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con la cantidad de E2 no etiquetado en la muestra. Una curva estándar es obtenida al trazar la concentración del estándar contra la absorbancia.

La concentración de E2 de las muestras y controles que corren concurrentemente con los estándares pueden ser calculados con la curva estándar.

Reactivos

1. Placa de micropozos cubiertos con IgG de Cabra Anti-Conejo, con 96 pozos
2. Estándares de referencia de Estradiol: 0, 10, 30, 100, 300, y 1000 pg/mL, Líquido, listos para su uso.

3. Reactivo Anti-Estradiol de Conejo.
4. Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP.
5. Reactivo TMB (un solo paso).
6. Solución de Paro (1N HCl).
7. Solución Búfer de lavado concentrado (50x).

Recolección y preparación del espécimen

1. Suero o plasma con EDTA pueden ser utilizados. Ningún pre-tratamiento especial de muestra es necesario.
2. Muestras de suero o plasma humano deben ser almacenadas de 2 a 8°C por hasta 24 horas, y deben ser congelados a -10°C o más, bajo para periodos más largos. No utilice muestras excesivamente lipémicos o hemolizados.
3. Las muestras que contienen azida sódica no deben ser utilizados en el ensayo

Procedimiento:

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
2. Agregue 25 µL de estándares, muestras, y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 50 µL de reactivo anti-Estradiol de conejo en cada pozo.
4. Agregue 100 µL de Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP en cada pozo.
5. Mezcle completamente por 30 segundos. Es muy importante mezclar totalmente.
6. Incube a temperatura ambiente (18 - 25°C) por 45 minutos.
7. Enjuague y sacuda suavemente los pozos 5 veces con solución búfer.
8. Agregue 100 µL de Solución TMB en cada pozo. Mezcle cuidadosamente por 10 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Detenga la reacción agregando 100 µL de Solución de Paro a cada pozo.

11. Mezcla cuidadosamente por 30 segundos. Es importante asegurarse que el color azul cambie a color amarillo completamente.

12. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de MicroElisa dentro de un plazo de 15 minutos.

Nota importante: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede afectar la precisión y elevar falsamente la absorbancia.

Cálculos:

1. Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras.
3. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida.

ANEXO #7

Determinación de Testosterona sérica

Procedimiento:

La prueba de testosterona EIA está basada en el principio competitivo entre la testosterona en la muestra y el conjugado de testosterona-HRP por un constante aumento en la cantidad de anti-testosterona de conejo. En la incubación los pozos recubiertos de cabra anti-IgG de conejo son incubados con 10 µL de estándar de testosterona, controles, muestras del paciente, 100 µL de testosterona-HRP reactivo conjugado con 50 µl de reactivo anti-testosterona de conejo y a 37° C por 90 minutos. Durante la incubación un aumento fijado de HRP-etiquetado de testosterona establece una competencia con la testosterona endógena, en él estándar, muestra o control de calidad del suero para fijar un número de sitios unidos en el anticuerpo específico de la testosterona. Esto, así como el aumento del conjugado peroxidasa de Testosterona, inmunológicamente se une en el micro pozo para determinar la concentración presente en las muestras.

Las no-uniones del conjugado peroxidasa de testosterona son ahora removidas de los micro pozos por medio de los lavados. Al agregar el reactivo TMB, éste es responsable de dar el color azul en una incubación a temperatura ambiente por 20 minutos. El desarrollo del color es detenido al adicionar la solución de paro (HCl) y la absorbancia es medida a 450 nm. La intensidad del color que se forme es proporcional a la cantidad de enzima presente e inversamente proporcional a la cantidad de testosterona en la muestra. La curva estándar es obtenida al graficar la concentración contra la absorbancia. La concentración de Testosterona de la muestra y al correr los controles con el estándar, puede ser calculada de la curva estándar.

Reactivos

1. Placa de micropozos cubiertos de Cabra Anti-Conejo IgG con 96 pozos
2. Estándares de referencia de Testosterona, que contienen 0, 0.1, 0.5, 2.0, 6.0 y 18 ng/mL. Líquido.
3. Reactivo Anti-Testosterona.
4. Reactivo Conjugado de Testosterona–HRP.

5. Control de Testosterona 1.
6. Control de Testosterona 2.
7. Reactivo TMB.
8. Solución de Paro.
9. Solución Buffer de lavado concentrado.

Recolección y preparación de la muestra

1. Solo muestras séricas son usadas en este test.
2. Las muestras no requieren ningún pre-tratamiento.
3. Las muestras de suero deben de ser almacenadas de 2-8 °C hasta por 24 horas y deben ser congeladas a -10 °C o menos para períodos más prolongados. No use muestras hemolizadas densamente o con lipemizado grueso.

Nota: Por favor, no use muestras que contenga azida de sodio en éste ensayo.

Procedimiento:

1. Asegurar el número de pozos deseados en el soporte.
2. Agregue 10 µL de los estándares, muestras y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µL del Reactivo Conjugado de Testosterona HRP en cada pozo.
4. Agregar 50 µL de Reactivo anti-testosterona de conejo en cada pozo.
5. Agite suavemente por 30 segundos. **Es muy importante que el mezclado sea completo.**
6. Incube por 90 minutos a 37°C.
7. Lave y enjuague la microplaca 5 veces con solución buffer de lavado (**Por favor no use agua de la llave**)
8. Agregar 100 µL de Reactivo TMB dentro de cada pozo. Mezclar cuidadosamente por 10 segundos.
9. Incubar a Temperatura ambiente (18-25°C) durante 20 minutos.
10. Para detener la reacción agregue 100 µL de solución de Paro a cada pozo.
11. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. **Es importante asegurar que todo el color azul cambie al amarillo completamente.**

12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de micro pozos ***dentro de un lapso de 15 minutos.***

Cálculo de los resultados

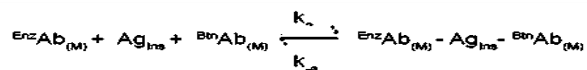
1. Calcule los valores de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/mL sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
3. Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de Testosterona en ng/mL desde la curva estándar.
4. En las muestras diluidas el resultado debe ser corregido por el factor de dilución apropiado.

ANEXO #8

Determinación de insulina

Fundamento: Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimático incluye anticuerpos de una alta afinidad y especificidad (Ab), (enzima conjugada e inmovilizada), con epítopes de reconocimiento diferentes, en exceso, y antígeno nativo (Ag). En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en la microplaca durante la interacción de estreptavidina cubierta sobre el pozo y agregado exógenamente un anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado.

Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo, resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo de sándwich soluble. La interacción esta ilustrada por la siguiente ecuación:



$\text{BnAb}_{(M)}$ = Anticuerpo Monoclonal Biotinilado (cantidad en exceso)

Ag_{Ins} = Antígeno Nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAb}_{(M)}$ = Anticuerpo monoclonal etiquetado (cantidad en exceso)

$\text{EnzAb}_{(M)} - \text{Ag}_{\text{Ins}} - \text{BnAb}_{(M)}$ = Complejo Antígeno-Anticuerpo

k_a = Valor Constante de Asociación

k_d = Valor Constante de Disociación

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción esta ilustrada abajo:



Estreptavidina = Estreptavidina inmovilizada en el pocillo.

Complejo Inmovilizado = Complejo de Sándwich unido a la superficie de la fase sólida.

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en

la fracción del anticuerpo-límite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando diversas referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

Reactivos:

- **Calibradores Insulina** – liofilizados- Iconos A-F

Seis (6) frascos de referencia del suero para el antígeno de Insulina en los niveles de 0(A), 5(B), 25(C), 50(D), 100(E) y 300(F) μ U/ml. Reconstituya cada frasco con 2mL de agua destilada o desionizada. Los calibradores reconstituidos son estables por sesenta (60) días entre 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

*Nota: los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra WHO 1st IRP 66/304.

- **Reactivo de Enzima de Insulina**

Un frasco que contiene la enzima etiquetada con afinidad purificada monoclonal de ratón x-insulina IgG, monoclonal biotinilado de ratón x-insulina IgG en solución, tinte y preservativo. Almacene a 2-8°C.

- **Microplaca Revestida con Estreptavidina** - 96 pozos

Una (1) microplaca con 96 pozos cubiertos con estreptavidina y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacénese a 2-8°C.

- **Solución Concentrada de Lavado**

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénese a 2-30°C.

- **Substrato A**

Un (1) frasco que contiene tetrametilbencidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

- **Substrato B**

Un (1) frasco que contiene peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en solución. Almacénese en 2-8°C.

- **Solución de Paro**

Un (1) frasco que contiene un ácido fuerte (1NHCl). Almacénese en 2-8°C.

Preparación de los reactivos

- *SOLUCION DE LAVADO*. Diluir el contenido del concentrado de lavado con 1000 mL de agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacénese a temperatura ambiente entre los 20-27°C por no más de 60 días.
- *SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO*. Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución “A” en el frasco etiquetado con Solución “B”. Mezcle y guarde a 2-8°C. Coloque la tapa amarilla sobre el frasco transparente para una fácil identificación. Mezcle y etiquete acordemente. Almacénese a 2-8°C.

Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.

Procedimiento del ensayo

Antes de proceder con el análisis, traiga todos los reactivos, referencias del suero y controles a temperatura ambiente (20-27°C).

1. Saque los micropozos necesarios para cada suero de referencia, controles y muestras. Guarde los micropozos nuevamente dentro de la bolsa de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.
2. Pipetee 0.050 mL (50 µL) de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.
3. Agregue 0.100 mL (100µL) de la solución del Reactivo de la Enzima de Insulina a todos los pozos. Es muy importante dispensar todos Los reactivos cerca del fondo de los micropozos.
4. Golpear suavemente uno de los extremos de la microplaca por 20- 30 segundos para mezclar. Selle la microplaca con una cubierta de plástico.
5. Incube por 120 minutos a temperatura ambiente (20-27°C)
6. Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, después golpee ligeramente la placa seca con el papel absorbente.
7. Agregue 300µL de la solución de lavado (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo o aspírelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. Un lavador automático o manual de placas puede ser utilizado. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada micropozo bien, presionando el

envase (evite burbujas de aire) para dispensar la solución de lavado. Decante y repita dos (2) veces adicionales.

8. Agregue 0.100 mL (100 μ L) de la solución de Substrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos. NO AGITE DESPUES DE ADICIONAR EL SUSTRATO

9. Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.

Agregue 0.050 mL (50 μ L) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.

11. Lea la absorbancia en cada pozo a 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de haber agregado la solución de paro.

Cálculo de resultados

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de Insulina en especímenes desconocidos.

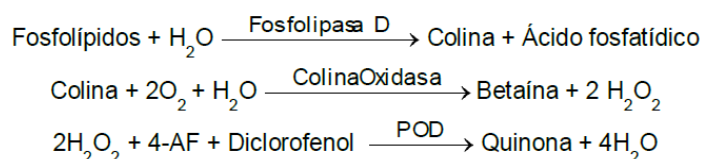
1. Registre la absorbancia obtenida del listado del lector del micro placas
2. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en μ IU/mL
3. Calcule la ecuación de la línea recta para la curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de Insulina para un desconocido, despeje x de la ecuación de la línea recta.

ANEXO #9

Determinación de fosfolípidos

Fundamento:

Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa D y la colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa (CHO) a betaína, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido de hidrógeno acopla oxidativamente a la 4- Aminofenazona (4-AF) y al diclorofenol formando una quinonamina coloreada:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fosfolípidos presentes en la muestra ensayada.

Reactivos:

- Tampón: Tris pH 7.55 50 mM, Diclorofenol 2.1 mM
- Enzimas: Fosfolipasa D 400 U/L, Colina oxidasa 2200 U/L
 Peroxidasa 3600 U/L, 4-Aminofenazona 1 mmol/L
- Calibrador de fosfolípidos: Patrón primario acuoso de fosfolípidos 300 mg/dL

Procedimiento

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 505 nm (490-550)

Cubeta: 1 cm paso de luz

Temperatura 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	---	10	---

Muestra (μL)	---	---	10
---------------------------	-----	-----	----

4. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C .
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Cálculos

(A) Muestra x 300 (Conc. Patrón) = mg/dL de fosfolípidos en la muestra

(A) Patrón

ANEXO #10

Determinación de Ácidos grasos libres

Reactivos

- Cloroformo
- Reactivo de cobre: Consiste en $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 40,0 g/litro; trietanolamina 99%, 120,0 ml/litro (135,0 g/litro). Se disuelve el nitrato cúprico en 500 ml de agua destilada, agregue la trietanolamina, y diluir a 1 litro con agua destilada.
- Reactivo cuprizona. Este consiste de ácido oxálico-bis (cyclohexylidenehydrazide), 0.40 g/litro de isopropanol. Disolver la cuprizona en 10 ml de cloroformo y se diluye con isopropanol para 1 litro. esta solución es estable durante al menos tres meses a temperatura ambiente.
- Reactivo amoníaco. 100 ml de una solución al 58% de NH_4OH (concentrado) se diluye hasta 1 litro con agua destilada agua.

Procedimiento

1. Añadir 50 μL de suero en un tubo de ensayo
2. A un tubo semejante, se añaden 50 μl de estándar de ácido oleico.
3. Para otro tubo de ensayo añadir 100 μl de agua, este será el blanco de reactivo.
4. Para todos los tubos de añadir 150 μl de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
5. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
6. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
7. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensaye cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
8. De cada tubo, pipetear 500 μl de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
9. A cada tubo, añadir 450 μl de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
10. A cada tubo, añadir 50 μl de solución de amoniaco, tapar y agite suavemente.

11. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 mm después de agitar con la solución de amoníaco.

Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta enérgicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

Cálculo

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

Concentración en mg/dl = (Abs muestra / Abs estándar) x 8.6 mg/dl

ANEXO #11

Separación de lipoproteínas plasmáticas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Frings. C. S. Foster, L. B. y Cohen, P. S. Clin, Chem, 17.111. 1971

Principio:

Separación de las lipoproteínas dependiente de la movilidad electroforética y del tamaño de las partículas. La resolución electroforética de las muestras pre teñidas con sudan Negro, se efectúa en un sistema discontinuo de pH en tres geles de diferente concentración.

Reactivos:

1. Tris-N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED)
 - a. Disolver 36.6 g de tris y 0.23 mL de TEMED en aproximadamente 100 mL de agua destilada. Añadir 48 mL de HCl 1N y diluir a 200 mL con agua destilada. La solución adquiere un pH de 8.9. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, esta solución es estable durante 3 meses.
2. Tris-TEMED
 - a. Disolver 5.98 g de tris y 0.46 mL de TEMED en agua. Añadir 48 mL de HCl 1 N y diluir a 100 mL con agua. Conservar en una botella ámbar, esta solución es estable durante 3 meses.
3. Acrilamida Bisacrilamida
 - a. Disolver 15 g de acrilamida y 0.4 g de bisacrilamida en agua y completar a 100 mL. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, ésta solución es estable durante 3 meses.
4. Sacarosa
 - a. Disolver 200 g de sacarosa en agua y diluir a 500 mL

5. Persulfato de Amonio

- a. Disolver 0.14g de persulfato amónico en agua y completar a 100 mL. Estable durante una semana a 4 °C en frasco ámbar

6. Solución colorante

- a. Añadir 250 mg de Negro Sudán a 30 mL de etanol absoluto. Mezclar bien. Diluir a 100 mL con agua. Conservar en un frasco ámbar. Estable 1 mes a temperatura ambiente.

7. Gel inferior

- a. Mezclar las soluciones 1, 3 y 7 a razón 1:1:2 (V/V). Preparar aproximadamente 1.2 mL por cada gel a separar.

8. Gel medio

- a. Mezclar las soluciones 2, 4, 7 y 6 a razón 1:2:1:4 (V/V), respectivamente. Conservar en frasco ámbar. Estable durante un mes a 4 °C.

9. Gel superior

Añadir 8 volúmenes de gel medio a dos volúmenes de colorante, mezclar suavemente por inversión. Preparar este gel inmediatamente antes de su empleo.

10. Solución tampón

- a. Disolver 6 g de tris y 28.8 de glicina en aproximadamente 850 mL de agua. Si hace falta, ajustar el pH a 8.3 con tris o con glicina. Diluir con agua hasta 1 litro.

Material:

Equipo electroforético apto para usar tubos 7 X 75 mm

Densitómetro

Procedimiento:

1. Añadir 1 mL de gel inferior recientemente preparado a cada tubo. Añadir cuidadosamente suficiente agua a la parte alta del tubo para evitar la formación de un menisco cuando polimerice el gel. Completada la polimerización, invertir los tubos y secar sobre papel absorbente.
2. Añadir 0.1 mL de gel medio a cada tubo y recubrir cuidadosamente con agua, dejar polimerizar.
3. Completada la polimerización, invertir los tubos y secar sobre un papel absorbente.
4. Depositar 70 μ L de suero o plasma y 0.1 mL de gel superior en cada tubo.
5. Mezclar cada tubo por inversión y depositar una capa de tampón.
6. Disponer los tubos en la cámara electroforética.
7. Añadir alrededor de 200 mL a los compartimientos superior e inferior de la cámara respectivamente.
8. Dejar efectuar la migración electroforética durante 35 minutos a 5mA por tubo de gel.

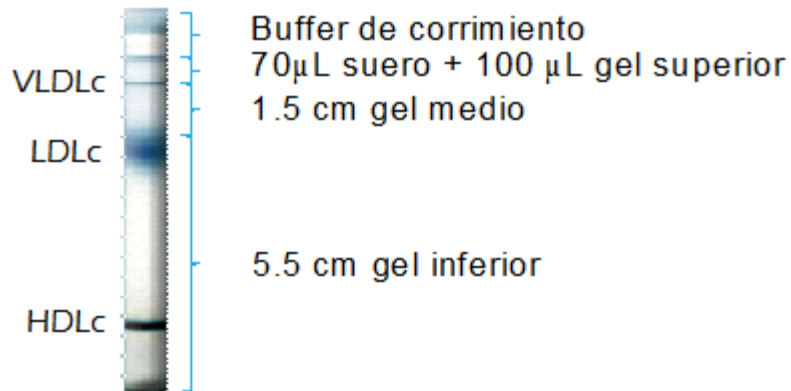
Resultados y observaciones

En menos tiempo se consigue una resolución de las lipoproteínas plasmáticas mejor que en la electroforesis en papel. Además de las 4 bandas correspondientes a la electroforesis en papel, pueden obtenerse tres bandas suplementarias cuyo posible significado está en estudio.

Obsérvese que la posición de las β -lipoproteínas y pre- β -lipoproteínas está invertida con respecto a la electroforesis en papel; en otras palabras, la movilidad en sentido creciente de las partículas en este soporte es: quilomicrones, β -lipoproteínas, pre- β -lipoproteínas, y α -lipoproteínas. Ello obedece a que la separación en poliacrilamida

depende, como hemos indicado, de la movilidad electroforética y del tamaño de las partículas.

Con poliacrilamida, se consigue una clara separación de entre β -lipoproteínas y pre- β -lipoproteínas, lo que facilita la clasificación de los pacientes hiperlipémicos.



ANEXO #12

Determinación de Glucógeno en tejidos

Reactivos

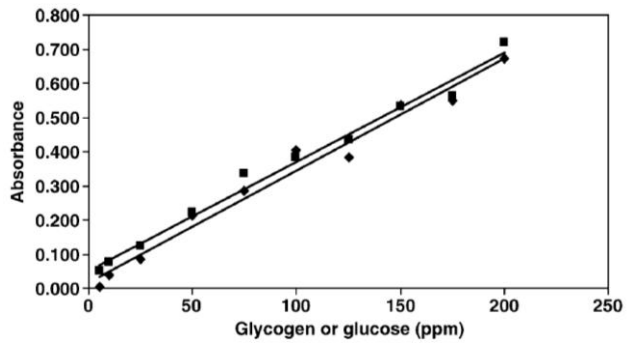
- Acido perclórico al 10 %
- Etanol concentrado
- Agua destilada
- Fenol al 5 %
- Ácido sulfúrico concentrado

Procedimiento

- 1.- Homogenizar 125 mg de tejido con 1 ml de HClO₄.
- 2.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 3.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 1)
- 4.- Re suspender el pellet de tejido con 1 ml de HClO₄.
- 5.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 6.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 2)
- 7.- Combinar el sobrenadante 1 y 2. (Sobrenadante 3)
- 8.- Agregar 2.5 ml de etanol al sobrenadante 3, agitar fuertemente.
- 9.- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- 10.- Extraer el sobrenadante (Sobrenadante 4) * y guardar, en el fondo del tubo se observará un precipitado blanco.
- 11.- Re suspender el precipitado blanco con 1 ml de agua destilada.
- 12.- Tomar una alícuota de la disolución de glucógeno (no. 11) de 100 µL
- 13.- Añadir 200 µL de fenol y agitar.
- 14.- Agregar 1 ml de ácido sulfúrico y agitar.
- 15.- Leer la absorbancia a 490 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 30 min después de agitar con el ácido sulfúrico.

*En caso de Hígado se puede realizar determinación la concentración de glucosa en el sobrenadante 4 y sumarse a la concentración total de glucógeno.

Cálculos



Regresión lineal de absorbancia contra glucógeno y estándar concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100, 125, and 150 ppm de conejo ($y = 0.0074x + 0.0347$; $R^2 = 0.9874$)

Se ocupó la ecuación de la recta para calcular la concentración de glucógeno elaborada por L. W. Bennett en 2007.

ANEXO #13

Cuantificación de Triglicéridos en tejido

Procedimiento:

1. Pesar 100 mg del tejido a analizar y colocarlos en un criotubo
2. Adicionar 800 μ L de SSI
3. Homogeneizar durante 1 minuto
4. Tomar 10 μ L del sobrenadante y colocarlos en un tubo.
5. Adicionar 1 mL del reactivo de triglicéridos
6. Esperar 15 minutos a temperatura ambiente
7. Leer a 505 nm.

Notas: La técnica seguida corresponde al anexo #1.

ANEXO #14

Cuantificación de proteínas totales

Método

Se siguió el reportado por Lowry en 1951

Reactivos:

- Solución patrón 1mg/mL
- Reactivo de Folin: Solución 1:2 en agua destilada
- Reactivo 3: Solución alcalina
 - a) Tartrato de Na^{2+} y K^{+} al 2%
 - b) Sulfato de Cu^{2+} al 1%

Diluir las soluciones a y b con una solución de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N, aforar a 100 mL.

Procedimiento:

Preparar curva de calibración con albúmina

# Tubo	Solución patrón	Agua	Reactivo de Folin	Reactivo 3	NaOH
5	3	117	200 μL	900 mL	100 μL
10	6	114	200 μL	1.5 mL	100 μL
20	12	108	200 μL	1.5 mL	100 μL
40	24	96	200 μL	1.5 mL	100 μL
70	42	88	200 μL	1.5 mL	100 μL
100	60	60	200 μL	1.5 mL	100 μL
150	90	30	200 μL	1.5 mL	100 μL

1. Tomar 20 μL del homogenado + 180 μL de agua destilada + 100 μL de NaOH 0.1 N + 1.5 mL del Reactivo 3 + 200 μL de reactivo de Folin.
2. Mezclar e incubar a 37°C, y Leer a 500 nm

ANEXO #15

Determinación de la actividad de Catalasa

Método: Reportado por Aebi en 1984

Reactivos:

- Buffer de fosfato de potasio 50 mM pH7.4
 - Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
 - Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)
- H_2O_2 30 mM

Procedimiento:

Pipetear en una cubeta:

Microtécnica

- 1.9 mL de buffer de fosfato de potasio / 635 μL
- 1.0 mL de H_2O_2 / 330 μL
- 100 μL Homogenado / 35 μL

Leer la absorbancia a 240 nm a los 0 y 2 minutos.

Cálculos:

La diferencia de absorbancias entre el minuto 2 y el 0, se multiplica por el coeficiente de extinción molar $692.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ y se ajusta a los mg de proteína presentes en el homogenado.

ANEXO #16

Técnica para evaluar la actividad de superóxido dismutasa

Fundamento del método: El Pirogallol en medio básico se auto-oxida generado en el medio de reacción radicales superóxido, de esta forma la reacción radicalaria se propaga, acelerando la auto-oxidación del Pirogallol cuya forma oxidada absorbe la luz a 420 nm. La presencia de un secuestrador de radicales superóxidos en el medio, como la SOD inhibe la autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma 1 U de SOD como la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de auto-oxidación del Pirogallol a 25°C y pH = 8,20.

Reactivos:

- Solución de Pirogallol 7.37 mM (9.3 mg en 10 mL de agua destilada)
- EDTA 60 mM (223.3 g EDTA en 10 mL de agua destilada)
- Tris-HCl pH 8.20 50 mM
 - Solución A: 0.2 M Tris (1.21 g Tris en 50 mL agua destilada)
 - Solución B: 0.2 M HCl (1.05 mL HCl 37% $\delta=1.19$ en 100 mL agua destilada)
 - Solución C: 50 mL (A)+21.9 mL (B), aforar a 200 mL de agua destilada y verificar el pH 8.20

Procedimiento

Ensayo blanco, de la reacción no inhibida:

Mezcle en una cubeta de cuarzo 2,8 mL de solución amortiguadora Tris-HCL, 100 μ L de agua destilada y 50 μ L de la solución de EDTA (concentración final 1mM), añada entonces 50 μ L de la solución de Pirogallol (concentración final 0,124mM), deje reaccionar por 10 segundos y mida a partir de este momento la diferencia de densidades ópticas en un minuto a 420 nm. Repita el procedimiento al menos tres veces; el valor resultante debe ser $\Delta D.O. = 0,020 \pm 0,001$. Este valor se tomará como $\Delta D.O.$ del blanco y representa la diferencia de densidades ópticas para la reacción no inhibida.

Nota: Si tras varias repeticiones el valor de $\Delta D.O.$ se aleja de 0,020 se puede incrementar (si es menor que 0,020) o disminuir (si es mayor que 0,020) la cantidad de solución de pirogallol siempre que se mantenga el mismo volumen final, por lo que

deberá adicionársele o sustraerse el volumen a la solución amortiguadora Tris empleada en la determinación.

Ensayo real:

Mezcle en una cubeta de cuarzo 100 µL de suero o plasma deslipidado u homogenado adicione 2,8 mL de solución amortiguadora Tris - HCl pH 8,20 y 50 µL de la solución de EDTA. Adicione entonces 50 µL de la solución de Pirogallol y después de 10 segundos de reacción determine la diferencia de D.O. en un minuto a 420 nm.

Nota: Para la microtécnica, se utilizan 50 µL de muestra + 25 µL EDTA + 100 µL Pirogallol + 940 µL Tris-HCl

Cálculos

La actividad enzimática se calcula mediante el empleo de la ecuación siguiente:

$$\left| \left[\frac{VM\Delta DO \text{ muestra} \times 100}{VM\Delta DO \text{ Blanco}} - 100 \right] \times 0.6 \right|$$

Dónde: Δ D.O.m: Diferencia de D.O. de la muestra.

Δ D.O.b: Diferencia de D.O. del blanco.

V.M. valor medio

ANEXO #17

Determinación de nitritos por el método de Griess

Método: Se siguió el reportado por Chao et. al 1992; modificado por León Chávez, 1999

Reactivos:

- Stock de nitritos
- a) Nitritos de sodio 1M: 0.69 g de NaNO_2 en 10 mL de H_2O destilada, para 1mM, 0.069 g en 1 mL de H_2O destilada.
- b) Stock 1mM: Diluir la solución a) 1:1000.

- Reactivo de Griess.

Se preparan las siguientes soluciones:

Solución A: 1.32% de sulfanilamida en 60% de ácido acético. Mezclar 1.32 g de sulfanilamida con 60 mL de ácido acético concentrado (puede ser glacial) y 39 mL de agua destilada, almacenar a 4°C.

Solución B: 0.1 g de N-1-naphthyl-ethylene diamino HCl. Mezclar 0.1 g en 100 mL de agua destilada (sensible a la luz) almacenar a 4°C.

Mezclar en relación volumen 1:1 la solución A con la solución B.

1. Preparar la siguiente curva de nitritos

# Tubo	Concentración [μM]	Stock de Nitritos 1mM	H_2O destilada	Reactivo de Griess	H_2O destilada
1	Blanco	-----	100 μL	100 μL	800 μL
2	1.0	1.0 μL	99.0 μL	100 μL	800 μL
3	2.5	2.5 μL	97.5 μL	100 μL	800 μL
4	5.0	5.0 μL	95.0 μL	100 μL	800 μL
5	10.0	10.0 μL	90.0 μL	100 μL	800 μL

Problema	¿?	100 μ L (hom)	-----	100 μ L	800 μ L
----------	----	-------------------	-------	-------------	-------------

2. Luego de adicionar el reactivo de Griess, esperar a que reaccione 10 minutos

3. Leer a 540 nm

El reactivo de Griess está compuesto por volúmenes iguales de n-1-naftiletildiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelta en ácido acético al 60%

ANEXO #18

Determinación de Malondialdehído

Reactivos:

- Solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (Patrón de MDA): Hacer una solución a una concentración de 10 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano. Adicionar 16.5 μL de este patrón de MDA (densidad 0.997 g/mL) en 10 mL de agua destilada o solución amortiguadora en que se encuentra diluida la muestra.
- Solución de N-metil-2-fenil-indol: Disolver 38 mg de N-metil-2-fenil-indol en 18 mL de acetonitrilo, para obtener una concentración de 10.3 mM. Antes de emplear la solución, debe diluirse adicionando aprox. 6 mL de metanol hasta alcanzar un volumen final de 24 mL (Solución I diluida).

Procedimiento:

Diluya la solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (patrón de MDA) en agua destilada o en la solución amortiguadora usada para diluir la muestra. Para ello tome 500 μL de la solución II y adiciónelos a un matraz volumétrico de 50 mL y complete hasta 50 mL. Con este procedimiento se logra una concentración de 100 μM del patrón de MDA (Solución II diluida).

Curva estándar de MDA

Solución II Conc. Final (μM)	0	0.5	1	2.5	5
Solución I diluida (μM)	650	650	650	650	650
Solución II diluida (μM)	0	25	50	100	150
Agua destilada	200	195	190	175	150

Agite en vortex, adicione 150 μL de ácido metanosulfónico o HCl 35%, agite en vortex y cierre los tubos. Incube a 45°C durante 1 hora. Enfríe a temperatura ambiente y lea la absorbancia a 586 nm contra agua destilada.

Muestras problema:

1. Adicionar 650 μL de la Solución I diluida y 200 μL del homogenado de la muestra, llevar a vibroagitación 3-4 seg.
2. Adicionar 150 μL de ácido clorhídrico al 35%
3. Mezcle vigorosamente y tape los tubos.
4. Incubar a 45°C durante 60 minutos
5. Enfriar a T° ambiente y centrifugar 15 min a 3000 rpm
6. Leer la absorbancia a 586 nm contra blanco de reactivo.

ANEXO #19

Determinación de glutatión total

Micro técnica

Preparación de la Muestra:

La muestra se homogenea en ácido sulfosalicilico 5% o bien si ya se tiene en PBS entonces a 100 μ L del sobrenadante hay que agregarle 5 mg directamente de ácido sulfosalicilico, homogenar en vortex y volver a centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4 °C y tomar de ese sobrenadante los 20 μ L necesarios para el análisis.

En este caso se homogenaron 150 mg de tejido en 500 μ L de PBS se centrifuga a 4 °C 10 000 rpm y se toman 100 de ese sobrenadante se le adicionan 5 mg de ácido sulfosalicilico se centrifuga de nuevo y el sobrenadante se ocupa; sin embargo la dilución inicial en PBS puede cambiar dependiendo del tipo de tejido en función de la actividad de la enzima que se encuentre en ese tejido porque si es muy poca hay que poner más tejido para sea posible detectarla mediante esta técnica y las deltas de absorbancia no sean muy pequeñas.

Reactivos

- **Buffer de trabajo diario:** 7mL de buffer de trabajo + 1 mL de solución DNTB
- **Buffer de trabajo (se prepara en agua destilada):** Guardar en frio, preparar diariamente y llevar a 20 °C para su uso. Lleva: 0.3 mM de NADPH en agua destilada (12.5 mg ----- 50 mL)
- **Solución de DNTB 6 mM** [5,5'-ditihobis-92-acidonitrobenzoico]] en solución buffer stock. Guardarlo en alícuotas de 1 mL a -20 °C. PM= 396 g/mol
- **Buffer stock (se prepara en agua destilada):** Fosfato de sodio monobásico 12.5 mM y EDTA disódico 6.3 mM. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH diluido en agua destilada o HCl diluido en agua destilada según sea el caso, al prepararlo

normalmente queda con un pH ácido por lo que hay que ajustar con NaOH diluido.

- **Enzima Glutación Reductasa 10 U/mL en buffer stock.**
- **Stock de GSH para la curva de calibración:** El estándar de GSH se prepara en buffer stock. Por cuestiones metodológicas de la cantidad que se pesa, se prepara 1 mL al 10 mM y de ahí se va tomando para la curva.

Preparación de la curva

Partiendo del estándar 10 mM de GSH, se realizan diluciones seriadas 1:10 en buffer stock hasta obtener un estándar al 10 μ M que es el que se ocupa para la curva.

Es muy importante hacer la curva (incluyendo el blanco) con ácido sulfosalicílico 4.31% o 5% y no con agua, para igualar las condiciones en que se encuentran las muestras porque de lo contrario dan absorbancias muy bajas en las muestras y dan valores negativos a la hora de hacer los cálculos utilizando la curva.

Pipetear en ese orden: buffer de trabajo diario + ácido sulfosalicílico 5 % + Estándar de GSH 10 μ M + Solución enzimática; esto es porque el análisis es cinético entonces es muy importante el tiempo de reacción por lo que se pone al final la parte enzimática que no transcurra mucho tiempo entre el pipeteo y la lectura y sea un resultado más confiable.

Concentración	Reactivo			
	Buffer de trabajo diario	Ácido sulfosalicílico 5 %	Estándar de GSH 10 μ M	Solución Enzimática
Blanco	160 μ L	20 μ L	-----	20 μ L
1 μ M	160 μ L	18 μ L	2 μ L	20 μ L
2 μ M	160 μ L	16 μ L	4 μ L	20 μ L
3 μ M	160 μ L	14 μ L	6 μ L	20 μ L
5 μ M	160 μ L	10 μ L	10 μ L	20 μ L
7 μ M	160 μ L	6 μ L	14 μ L	20 μ L

Leer cada minuto a 405 nm durante 3 minutos.

La curva se hace por triplicado.

Una vez teniendo la absorbancia de la curva hay que calcular la delta de absorbancias por minuto y luego sacar el promedio de los 3 minutos y con eso se hace la curva de delta de absorbancia /minuto vs concentración.

Se decidió seguir la reacción durante 3 minutos en vez de 5 porque a 3 minutos son más evidentes y constantes las deltas, mientras que a 5 minutos en la mayoría de los casos la reacción ya se acabó la delta ya no es tan evidente. Por esa misma razón es más conveniente realizar las lecturas cada minuto en vez de cada 30 segundos porque si no las deltas son muy pequeñas y a veces no se observa si varían.

Procedimiento para las muestras:

1. Homogenizar muestra en ácido sulfosalicilico 5 % (muy importante)
2. Centrifugar a 4 °C y 10 000 rpm durante 10 minutos, usar el sobrenadante para la determinación.
3. Reacción: 160 µL de buffer de trabajo diario + 20 µL de muestra + 20 µL de enzima
4. Leer la delta de absorbancia inicial y luego cada minuto a 405 nm en espectrofotómetro atemperado a 37 °C, durante 3 minutos.

Cálculos: se obtiene la cantidad de glutatión total en la cantidad de sobrenadante utilizada a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración.
 $y=0.0045x+0.0235$; $R^2 = 0.9991$

Nota: El volumen de reacción aquí presentado es lo máximo que se puede escalar porque si se intenta reducir más ya no es detectable y la enzima ya no lleva a cabo la reacción completa dando resultados incorrectos o incluso con signo negativo.

ANEXO #20

DETERMINACION DE GLUTATION OXIDADO (GSSG)

Microtécnica

Preparación de la Muestra:

La muestra se homogeneiza en ácido sulfosalicílico 5 % o bien si ya se tiene en PBS entonces a 100 μ L del sobrenadante hay que agregarle 5 mg directamente de ácido sulfosalicílico, homogeneizar en vortex y volver a centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4 °C y tomar de ese sobrenadante los 20 μ L necesarios para el análisis.

En este caso se homogeneizaron 100 mg de tejido en 500 μ L de PBS se centrifuga a 4 °C 10 000 rpm y se toman 100 de ese sobrenadante se le adicionan 5 mg de ácido sulfosalicílico se centrifuga de nuevo y el sobrenadante se ocupa; sin embargo la dilución inicial en PBS puede cambiar dependiendo del tipo de tejido en función de la actividad de la enzima que se encuentre en ese tejido porque si es muy poca hay que poner más tejido para sea posible detectarla mediante esta técnica y las deltas de absorbancia no sean muy pequeñas.

Reactivos

- **Buffer de trabajo diario:** 7mL de buffer de trabajo + 1 mL de solución DNTB
- **Buffer de trabajo (se prepara en agua destilada):** Guardar en frío, preparar diariamente y llevar a 20 °C para su uso. Lleva: 0.3 mM de NADPH en agua destilada (12.5 mg ----- 50 mL)
- **Solución de DNTB 6 mM** [5,5'-ditihobis-92-acidonitrobenzoico)] en solución buffer stock. Guardarlo en alícuotas de 1 mL a -20 °C. PM= 396 g/mol
- **Buffer stock (se prepara en agua destilada):** Fosfato de sodio monobásico 12.5 mM y EDTA disódico 6.3 mM. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH diluido en agua destilada o HCl diluido en agua destilada según sea el caso, al prepararlo normalmente queda con un pH ácido por lo que hay que ajustar con NaOH diluido.
- **Enzima Glutación Reductasa 10 U/mL en buffer stock.**

- **Stock de GSH para la curva de calibración:** Se prepararon 500 μL de estándar de GSSG 50 mM. PM = 612.6 g/mol

Preparación de la curva

Pipetear en ese orden: buffer de trabajo diario + ácido sulfosalicilico 5 % + Estándar de GSSG 50 μM + Solución enzimática; esto es porque el análisis es cinético entonces es muy importante el tiempo de reacción por lo que se pone al final la parte enzimática que no transcurra mucho tiempo entre el pipeteo y la lectura y sea un resultado más confiable.

La curva se hace por triplicado y se lee absorbancia inicial y la delta de absorbancia por minuto durante 3 minutos a 405 nm, se saca el promedio de delta y eso es lo que se gráfica.

Concentración	Reactivo			
	Buffer de trabajo diario	Ácido sulfosalicilico 5 %	Estándar de GSSG 1 mM	Solución Enzimática
Blanco (0 mM)	80 μL	10 μL	-----	10 μL
0.1 mM	80 μL	9 μL	1 μL	10 μL
0.3 mM	80 μL	7 μL	3 μL	10 μL
0.5 mM	80 μL	5 μL	5 μL	10 μL
0.7 mM	80 μL	3 μL	7 μL	10 μL
0.85 mM	80 μL	1.5 μL	8.5 μL	10 μL
1 mM	80 μL	-----	10 μL	10 μL

Procedimiento para las muestras:

1. Homogenizar muestra en ácido sulfosalicilico 5 % (muy importante)
2. Centrifugar a 4 °C y 10 000 rpm durante 10 minutos, usar el sobrenadante para la determinación

3. 100 μL de sobrenadante + 2 μL de 2-vinilpiridina + 8 μL de trietanolamina (el pH debe estar entre 6.8 y 7.2, si el pH excede utilizar menos trietanolamina y si es más bajo utilizar mas). Mezclar en vortex. Esperar 1 hora. Centrifugar a 4 °C y 10 000 rpm durante 5 minutos.
4. 80 μL de buffer de trabajo diario + 10 μL de muestra (proveniente del paso anterior) + 10 μL de la solución enzimática.
5. Leer a 405 nm absorbancia inicial y luego la delta de absorbancia/ minuto durante 3 minutos y sacar el promedio. Proceder a hacer los cálculos
6. Para los cálculos se utiliza la ecuación de la recta despejando x, ecuación de la línea recta: $y=0.5776x+0.0443$ $R^2 = 0.9858$

GSH= Glutación total - GSSG

ANEXO #21

Técnica para deshidratación, embebido y corte de tejidos en parafina

- Una vez obtenidos los tejidos, colocar en solución con formalina al 4% en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina.
- Colocar los tejidos en casetes para inclusión.

Seguir el proceso:

1. PBS 1X, durante 45 minutos, para limpiar la formalina.
2. Alcohol 70%, 1 hora
3. Alcohol 80%, 1 hora
4. Alcohol 96% 1, 1 hora
5. Alcohol 96% 2, 1 hora
6. Alcohol 100% 1, 1 hora
7. Alcohol 100% 2, 1 hora
8. Alcohol-Xilol (1:1), 1 hora
9. Xilol 1, 1 hora
10. Xilol 2, 1 hora
11. Xilol-Parafina (1:1), 1:30 horas
12. Parafina 1, 1 hora
13. Parafina 2, 1 hora
14. Parafina 3 (Inclusión)

Corte de tejidos

Se obtuvieron 6 bloques de parafina de cada grupo de los cuales se cortaron 7 laminillas de cada bloque a un espesor de 3 μ m, colocados en laminillas previamente sialinizadas, se dejaron secar y se almacenaron para realizar las tinciones, e inmunohistoquímicas o inmunofluorescencias correspondientes.

ANEXO #22

Tinción de Hematoxilina-Eosina

Reactivos

- Tren de deshidratación
 - Xilol (2)
 - Alcohol-Xilol (1:1)
 - Alcohol 100% (2)
 - Alcohol 96% (2)
 - PBS 1X
- Hematoxilina de Harris
- Alcohol ácido
- Carbonato de Litio 1%
- Eosina
- Resina

Procedimiento

1. Desparafinar y deshidratar los tejidos como se indica a continuación:
 - a. Xilol 1-10 minutos
 - b. Xilol 2-15 baños/3 minutos
 - c. Xilol-alcohol -15 baños/3 minutos
 - d. Alcohol 100 (1) -15 baños/3 minutos
 - e. Alcohol 100 (2) -15 baños/3 minutos
 - f. Alcohol 96 (1) -15 baños/3 minutos
 - g. Alcohol 96 (2) -15 baños/3 minutos
 - h. PBS 1X -15 baños/3 minutos
2. Colocar las laminillas en hematoxilina de Harris 6 minutos

3. Lavar con agua destilada hasta quitar el color morado
4. Diferenciar en alcohol ácido (1 baño rápido)
5. Lavar con agua de la llave
6. Colocar en solución de carbonato de Litio 1%, hasta el vire de morado a azul
7. Lavar con agua destilada
8. Colocar en solución de eosina durante 2 minutos
9. Lavar bien en agua destilada
10. Regresar las laminillas por el tren de deshidratación en el orden inverso con los mismos tiempos.
11. Montar las laminillas en resina (no dejar que el xilol se seque para facilitar que la resina se distribuya por capilaridad y evitar la formación de burbujas)

Notas: El carbonato de Litio debe ser reciente (no más de un mes), ya que si no el vire de la hematoxilina no es adecuado o no se da.

Cuando se utilizan colorantes nuevos, usualmente los tiempos de hematoxilina y eosina se reducen a 5 y 1 minuto respectivamente.

Verificar la tinción al microscopio antes de montar todas, de existir errores, corregirlos.

ANEXO #23

Técnica de Inmunohistoquímica

Reactivos:

- Tren de deshidratación (Ver anexo #22)
- Solución de recuperación antigénica Diva Decloacker Biocare (1:10)
- H₂O₂ 0.3%
- Albúmina libre de IgG al 2% en SSI
- Anticuerpos primario y secundario
- Diaminobenzidina (DAB)
- Hematoxilina de Harris
- Carbonato de Litio 1%
- Resina
- Cloro

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas por 40 minutos en la estufa a 40°C
2. Desparafinar y deshidratar los tejidos (Ver anexo #)
3. Poner las laminillas en la solución de recuperación de antígenos durante 40 min a 60°C
4. Dejar enfriar 20 minutos
5. Lavar tres veces con PBS 1X
6. Ubicar las laminillas en la solución de H₂O₂ 0.3% durante 10 minutos para inactivar la peroxidasa endógena.
7. Lavar dos veces con PBS 1X
8. Hacer zonas hidrófobas alrededor de cada tejido en la laminilla con lápiz de parafina (no dejar que los tejidos se sequen)
9. Bloquear con albúmina 2% durante 2 horas (100 µL por laminilla)
10. Lavar 3 veces con PBS 1X
11. Colocar el anticuerpo primario en la dilución establecida por la casa comercial, o por prueba y error y dejar toda la noche. (100 µL por laminilla)

12. Lavar 3 veces con PBS el anticuerpo
13. Colocar el anticuerpo secundario en la dilución establecida durante 2 horas (100 μ L por laminilla).
14. Lavar con PBS 1X, 3 veces
15. Revelar con DAB (15-30 segundos)
16. Inactivar la DAB en solución acuosa de cloro
17. Colocar las laminillas en Hematoxilina de Harris 3 minutos
18. Lavar con agua destilada
19. Virar con carbonato de Litio 1%
20. Lavar con agua destilada
21. Regresar las laminillas por el tren de deshidratación en el orden inverso con los mismos tiempos.
22. Montar las laminillas en resina (no dejar que el xilol se seque para facilitar que la resina se distribuya por capilaridad y evitar la formación de burbujas).

ANEXO #24

Técnica de Inmunofluorescencia

Reactivos:

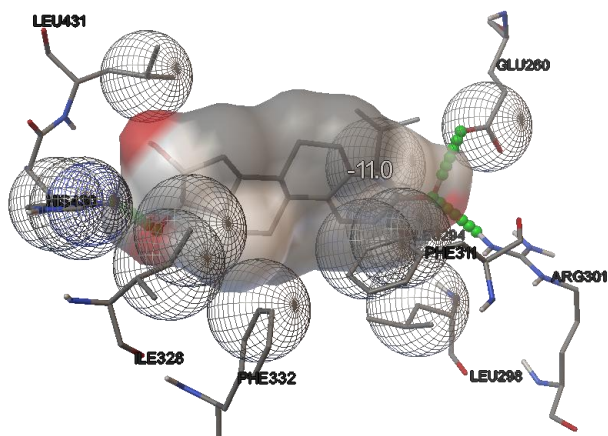
- Tren de deshidratación (Ver anexo #22)
- Solución de recuperación antigénica Diva Decloacker Biocare (1:10)
- Albúmina libre de IgG al 2% en SSI
- Anticuerpos primario y secundario
- Vectashield con DAPI
- Esmalte de uñas transparente

Procedimiento:

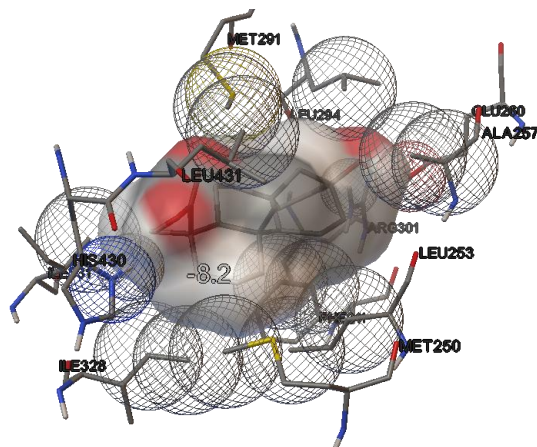
1. Colocar las laminillas por 40 minutos en la estufa a 40°C
2. Desparafinar y deshidratar los tejidos (Ver anexo #22)
3. Poner las laminillas en la solución de recuperación de antígenos durante 40 min a 60°C
4. Dejar enfriar 20 minutos, Lavar tres veces con PBS 1X
5. Hacer zonas hidrófobas alrededor de cada tejido en la laminilla.
6. Bloquear con albúmina 2% durante 2 horas (100 µL por laminilla), Lavar 3 veces con PBS 1X
7. Colocar el anticuerpo primario en la dilución establecida por la casa comercial, o por prueba y error y dejar toda la noche. (100 µL por laminilla), Lavar 3 veces con PBS el anticuerpo
8. Colocar el anticuerpo secundario en la dilución establecida durante 2 horas (100 µL por laminilla), desde este paso todo el procedimiento se realiza en oscuridad. Lavar con PBS 1X, 3 veces
9. Dejar que las laminillas se sequen por completo
10. Colocar 5 µL por tejido de Vecta shield con DAPI
11. Poner un cubreobjetos y sellar con esmalte.
12. Dejar que las laminillas se sequen y guardarlas en refrigeración.

ANEXO #25

Análisis molecular de Docking



Tipo de Receptor: Estrógenos β
Ligando a evaluar: Estradiol
Energía de Afinidad: -11.0 Kcal/mol
Aminoácidos: M291, L294, L432, E260, R301, F311, L253, M250, L430, I328, I331.
Tipo de enlace: Hidrofóbico / Puente de Hidrógeno



Tipo de Receptor: Estrógenos β
Ligando a evaluar: Steviol
Energía de Afinidad: -8.2 a -8.0 Kcal/mol
Aminoácidos: M291, L294, L432, E260, R301, F311, L253, M250, L430, I328, I331.
Tipo de enlace: Hidrofóbico

