

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**



**INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

**“Estudio sobre el efecto hipoglucémico, antioxidante y antiinflamatorio de  
*Tillandsia usneoides* en ratones CD1”**

**PRESENTA:**

ESCOBAR PÉREZ PAOLA STEPHANY  
08270322

**ASESORES:**

DRA. MARIA DEL CARMEN ESCOBAR VILLANUEVA  
DRA. PATRICIA GUADALUPE SANCHEZ ITURBE

**REVISORES:**

DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO  
ING. JAVIER RAMÍREZ DÍAZ

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA**

**Periodo de Realización: Febrero- Junio 2013**

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. JUSTIFICACIÓN.....	4
III. OBJETIVOS.....	5
IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO.....	6
V. PROBLEMAS A RESOLVER.....	7
VI. LÍMITES Y ALCANCES.....	8
VII. FUNDAMENTO TEÓRICO .....	9
VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS.....	22
IX. RESULTADOS, PLANOS, GRÁFICOS Y PROGRAMAS .....	25
X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	32
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	34
XII. ANEXOS.....	36

## I. INTRODUCCIÓN

La diabetes Mellitus (DM) representa uno de los problemas principales de salud a nivel mundial y es una de las enfermedades con los más altos índices de prevalencia y mortalidad. La DM se puede definir como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por un estado de hiperglucemia crónica que obedece a la falta de actividad insulínica, lo que origina anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Dichas anormalidades determinan varios síntomas y signos característicos (poliuria, polidipsia, polifagia, astenia, glucosuria, cetonemia, etc.) y pueden llevar al desarrollo de complicaciones agudas y crónicas, tales como cetoacidosis, coma hiperosmolar, macro- y microangiopatía, nefropatía, retinopatía, neuropatía e infecciones recurrentes. Dichas complicaciones son las principales causas de la invalidez y mortalidad de los pacientes con DM.

El tratamiento de la DM se realiza con base en **4** factores fundamentales: educación del paciente en cuanto a su enfermedad, ejercicio físico, dieta y medicamentos hipoglucemiantes.

La Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) estima que el costo directo a nivel mundial en atención a la Diabetes, a personas de entre 20 y 79 años de edad, va de los 232 a los 422 miles de millones de dólares anuales. Si el incremento de la diabetes continúa de acuerdo a las predicciones, este costo llegará en 2025 a un rango de 303 a 559 miles de millones de dólares.

Las necesidades actuales de salud en el mundo y la crisis económica de muchos países como el nuestro, hacen indispensable un estudio más profundo de los recursos médicos disponibles, entre los cuales, se encuentran las plantas medicinales.

Dentro de la medicina tradicional la DM es tratada con base en dieta, ejercicio físico y entre plantas medicinales, las cuales se conocen popularmente como plantas antidiabéticas. A pesar de que en el mundo se utilizan más de 1,200 plantas en el control empírico de la DM, la gran mayoría de ellas no ha sido investigada farmacológicamente. De más de 100 plantas se ha logrado caracterizar un agente hipoglucemiante potencial y la actividad hipoglucemiante de otras 350 ya ha sido convalidada experimental y/o clínicamente.

En México la población utiliza aproximadamente 150 plantas en el control empírico de la DM. De éstas, alrededor de la tercera parte ha sido investigada experimentalmente y en la mayoría se ha detectado actividad hipoglucemiante

*Tillandsia usneoides* se emplea como antidiabético en la comunidad de San Miguel Pipillola, Tlaxcala, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto hipoglucémico de esta planta en ratones.

Para estudiar las alteraciones producidas por DM se han desarrollado modelos de diabetes experimental en animales como el perro y la rata. La diabetes experimental en animales se ha logrado administrando compuestos como el Alloxana y la estreptozotocina (STZ). Se ha reportado que la STZ aplicada por vía intravenosa provoca diabetes mellitus en ratas y perros.

Hay reportes de que la administración de Alloxana, mediante diferentes vías, provoca diabetes mellitus, sin embargo, no son específicos al explicar que tan severa es la diabetes. Para lograr el objetivo de este trabajo se trató de estandarizar la administración de este fármaco, mediante distintas dosis y vías de administración.

## II. JUSTIFICACIÓN

La diabetes tipo 2 (DT2) es reconocida por la OMS como una amenaza mundial. En 2005 se registraron 1.1 millones de muertes debidas a la diabetes, de las cuales alrededor de 80% ocurrieron en países de ingresos bajos o medios. En México, la DT2 ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, sin distinción de género y de conformidad con la información de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT) la prevalencia aumentó a 14%, lo que representa un total de 8 millones de personas con diabetes (FMD, 2010).

Debido al alto costo de los tratamientos para la DT2 gran parte de la población utiliza plantas medicinales como única alternativa a su alcance para resolver sus necesidades de salud. De la gran variedad de plantas utilizadas en México, *Tillandsia usneoides* también se emplea como antidiabético en la comunidad de San Miguel Pipillola, Tlaxcala, aquí se usa la cocción de la planta entera como agua de tiempo. Sin embargo, en la actualidad no existen estudios científicos que validen su utilidad en la diabetes. En el presente proyecto se propone determinar si las plantas:

- 1) Tienen efecto hipoglucémico, a través de un aumento en la producción de insulina por el páncreas.
- 2) Tienen efecto antiinflamatorio mediante la cuantificación de citocinas involucradas en el proceso inflamatorio.

Así mismo, se medirá la expresión de la proteína HMGB1 en plasma, como un marcador temprano de daño celular que, de ser posible su bloqueo por exposición a los extractos acuosos de las plantas mencionadas, podría evitar que las complicaciones microvasculares de la diabetes progresen.

### III. OBJETIVOS

- Objetivo general

Determinar el posible efecto de *Tillandsia usneoides* como agente hipoglucémico, para evitar daño oxidante sistémico y la inflamación en ratones con diabetes experimental inducida

#### Objetivos particulares

- Evaluar el efecto hipoglucémico en presencia de 5 diferentes dosis de los extractos acuosos de *Tillandsia usneoides*, utilizando como modelo experimental a ratones de la cepa CD1.
- Determinar la respuesta antioxidante de hígado y páncreas de los ratones en condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas, en presencia de *Tillandsia usneoides*.
- Relacionar la secreción de la proteína HMGB1 de ratones en condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas, tratados con diferentes dosis de extracto acuoso de *Tillandsia usneoides*.

## IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El proyecto “Estudiar el efecto hipoglucémico, antioxidante y antiinflamatorio de *Tillandsia usneoides* en ratones CD1” se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I), ubicada en San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, México.

El laboratorio de Farmacología se encuentra bajo la supervisión del Dr. Rubén Román Ramos y el Dr. Francisco Javier Alarcón. Esta área consta de aparatos como balanza analítica, campana de flujo laminar, el reflowtron, microcentrífuga, vórtex, termocicladores para PCR de punto final; área de electroforesis para geles de agarosa y acrilamida; área de visualización de ADN mediante el uso de Bromuro de Etidio (Transiluminador de luz UV y fotodocumentador), una fuente de voltaje para el corrimiento de las muestras respectivas, instrumentos como micropipetas de diferentes volúmenes, materiales de plástico como tubos eppendorf para extracción, dilución. Además, consta de materiales de cristal y un área de reactivos necesarios para pruebas de Biología Molecular. Para el almacenamiento (-20 ° C) y protección de las muestras y soluciones se cuenta con un refrigerador y congelador. Con respecto a la preparación de geles de acrilamida (Western Blot, Oxi Blot), se cuenta con un microondas para su fundición y una autoclave para la esterilización de material. En la misma Unidad de Iztapalapa se encuentra el Bioterio, en donde se encargaron del cuidado de los ratones.



## V. PROBLEMAS A RESOLVER

Se pretende comprobar si el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* en diferentes concentraciones, es capaz de alterar los niveles de glucosa en sangre, si esto es así, entonces se ocasionara menor daño oxidante y como consecuencia menor inflamación en ratones con diabetes inducida.

Para esto, se realizó un estudio agudo de *Tillandsia usneoides* en ratones normoglucémicos, es decir, ratones con una glucemia dentro del rango para ser considerado como sanos. A sabiendas de cuál es la dosis idónea para el estudio crónico, se procedió a inducir una diabetes química en ratones con Alloxana, fármaco empleado en quimioterapia, que se ha observado entre sus efectos adversos induce a diabetes; para realizar un estudio crónico con una duración de 30 días en ratones diabéticos y observar el efecto del extracto de *Tillandsia usneoides*.



## VI. LÍMITES Y ALCANCES

Para inducir una diabetes química con Alloxana en ratones se realizaron pruebas con distintas dosis de Alloxana; con dos vías de administración diferentes. Se administró 25mg/Kg de peso vía intravenosa, se determinó la glucosa en sangre, y los valores obtenidos se encontraban dentro del rango permitido para un individuo normoglucémico. Se procedió con una segunda dosis de Alloxana 25mg/Kg de peso. Los valores de glucosa en sangre obtenidos, no fueron los de un individuo diabético. Se decidió utilizar una vía de administración diferente, se administraron 75mg/Kg de peso vía intraperitoneal. Se volvió a medir glucosa en sangre, sin obtener los resultados esperados. Se procedió a administrar una segunda dosis de 75mg/KG de peso vía intraperitoneal, y en otro grupo 100mg/Kg de peso vía intraperitoneal. Al medir los niveles de glucosa en sangre los valores obtenidos no están en el rango de un individuo diabético. El no contar con la dosis ideal de Alloxana fue una gran limitante que tuvo como consecuencia realizar el estudio crónico en ratones normoglucémicos, en ratones sin diabetes.

El reactivo de Bradford se terminó antes de iniciar el experimento, por lo que fue necesario hacer, en lugar de prueba de Bradford, prueba de Lowry.

La mayor limitante en este proyecto, fue el límite de tiempo; ya que no se tuvo el tiempo suficiente para probar mayores dosis de Alloxana y provocar una diabetes química. Además de que solo se pudieron realizar los parámetros bioquímicos en plasma, ya no en hígado y páncreas.

En los antecedentes se pueden encontrar estudios con *Tillandsia usneoides* en ratones diabéticos. Por lo cual este estudio es conveniente para saber lo que ocasiona esta planta en un individuo sano, ya que existe la creencia popular de que al ser un producto natural es “benéfico” para la salud y eso no siempre es así.

El estándar para determinar la secreción de la proteína HMGB1, no estaba a nuestra disposición, y el nuevo kit llegaría aproximadamente en septiembre, por lo cual no se pudo determinar esta proteína.

## VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

La diabetes mellitus (DM) representa uno de los problemas principales de salud a nivel mundial y es una de las enfermedades con los más altos índices de prevalencia y mortalidad. Los criterios para el diagnóstico de la DM están relacionados con diversas técnicas de laboratorio para determinar:

1. La concentración de glucosa en sangre
2. La concentración de glucosa en orina
3. Los niveles de hemoglobina u otras proteínas ligadas a azúcares reductores o proteínas glicadas. (Kennedy, 1992)

De acuerdo con las recomendaciones del comité de expertos de la **American Diabetes Association**, organismo encargado de evaluar los avances en el conocimiento acerca de la DM, los criterios para obtener un diagnóstico de DM con base en la determinación de la concentración de glucosa en sangre, deben abocarse a los tres procedimientos generales siguientes:

- 1) Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida de peso) además de mayor concentración de glucosa plasmática al azar (a cualquier hora del día)  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol).
- 2) Glucosa plasmática en ayunas (al menos de 8 horas)  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol).
- 3) Realizar mediciones mediante pruebas de tolerancia a la glucosa orales (PTGO).

Un nivel de glucosa plasmática en ayunas igual o superior a 126 mg/dL en dos ocasiones indica que la persona es diabética; si las mediciones se hacen al azar, el valor de la glucemia no debe sobrepasar los 200 mg/dl en más de una ocasión. La limitación de estos dos primeros procedimientos es que, en algunos casos, no pueden detectar disfunción metabólica (debido a que estas pruebas son poco sensibles), lo que hace necesario, realizar PTGO, sobre todo en aquellos pacientes con glucemias en ayunas entre 116 y 125 mg/dL (Nelson, 1988; Singer y col., 1989; Trujillo y col., 1996).

Para realizar una Prueba de Tolerancia a la Glucosa (PTGO) se requiere de la ingesta de glucosa siendo de 75 g por individuo en adultos y de 1.75 g/kg en niños. La prueba se realiza después de un ayuno de 10 a 16 horas y se toman muestras sanguíneas en ayunas, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la carga de glucosa. Los sujetos deben ingerir durante los tres días previos al estudio mínimo 150 g diarios de carbohidratos. Un diagnóstico positivo de DM, mediante esta prueba, se obtiene cuando al menos dos valores de glucosa plasmática son mayores o iguales a 200 mg/dL, incluyendo el valor a las

2 horas (ADA, 1997). En un paciente diabético la PTGO no debe realizarse, ya que contribuiría a agravar el estado diabético el paciente (Nelson, 1988; Nathan, 1989).

La medición de glucosa urinaria, por su parte, es generalmente una prueba diagnóstica inadecuada. Aunque es útil para detectar pacientes cuya hiperglucemia está produciendo un exceso de orina, aún en este caso es necesario confirmar el diagnóstico con una prueba de glucosa sanguínea (Singer y col., 1989).

La medición de hemoglobina glicada principalmente HBA1 (antes conocida como hemoglobina glucosilada) puede servir en el diagnóstico de la DM (Roth, 1983). Sin embargo, la prueba en general es incapaz de detectar casos de diabetes leve o con disminución de tolerancia a la glucosa. En algunos casos, la prueba puede dar resultados positivos para la diabetes, cuando en realidad se trata de sujetos sanos, por lo que para obviar estas dificultades, el médico debe confirmar todas las pruebas de hemoglobina glicada elevada con una PTGO (Medow, 1997).

En general, se puede decir que los criterios diagnósticos basados en la hemoglobina glicada correlacionan bien con los correspondientes basados en la glucemia. Una glucemia inferior a 160 mg/dL corresponde con valores de HBA1 menores a 9%, glucemias entre 169 y 230 mg/dL correlacionan con valores de HBA1 de 9 a 11%. Valores más altos de glucosa plasmática con intervalos de 230 a 310 mg/dL equivalen a HBA1 de 11 a 14% (Singer y col. 1989; Tchobroutsky, 1991).

Se acepta de manera general que los cambios metabólicos y tisulares característicos de la diabetes mellitus pueden evitarse mediante un adecuado control de la glucemia. Dado que la glucemia en los diabéticos se encuentra alta como consecuencia de la falta de actividad insulínica, en algunos casos la tendencia en el tratamiento ha sido administrar insulina exógena y en otros incrementar de alguna manera la secreción y/o la actividad de la insulina endógena. El tratamiento de la diabetes mellitus se realiza fundamentalmente con base en cuatro factores que son: la educación del paciente, ejercicio físico, dieta adecuada y medicamentos hipoglucemiantes (Vinik y Richardson, 1997; Baliga y Fonseca, 1997).

La educación del paciente en cuanto a su enfermedad, debe iniciar con una comprensión de los aspectos de la DM, esto es, para que el paciente participe activamente en el manejo de su enfermedad, debe conocerla por lo menos en sus principales aspectos etiológicos, de diagnóstico, control y complicaciones. La instrucción del paciente diabético debe abarcar también conocimientos de: hábitos higiénicos, cuidados de la piel y de los pies;

cuidado dental y de la vista; y de salud general. Así como, vigilancia de la glucemia y glucocetonuria, técnicas de inyección, características de los comas hipoglucémico y cetoacidótico, como prevenirlos, identificarlos y tratarlos. El control de la DM será efectivo siempre y cuando el paciente participe en él activamente, ya que la responsabilidad cotidiana del control de la DM recae en el propio enfermo, quedando al médico una supervisión y asesoría. Sin la colaboración del enfermo, la dieta, el ejercicio físico y la fármaco-terapia quedan inválidos en cuanto a su objetivo principal (Rubín y col., 1989; Brennan, 1996).

El ejercicio físico, es necesario en los pacientes diabéticos, porque aumenta considerablemente la utilización de la glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos circulantes en la sangre, fortalece los músculos, mantiene en todos los tejidos y órganos la circulación sanguínea óptima, evita el almacenamiento de grasa, mantiene la elasticidad y aumenta la resistencia general del organismo, disminuye la angustia y la ansiedad y mejora el sueño y bienestar (Gulias-Herrero, 1997; Larsen, 1997).

La dieta, ha jugado un papel fundamental en la diabetes mellitus, es aún la base del tratamiento en diabéticos obesos y un factor indispensable en la terapia insulínica o con hipoglucemiantes orales (Derot y Tchobroutsky, 1970). La dieta es importante en el control del peso corporal, ya que la obesidad está relacionada con la disminución en el número de receptores para la insulina y por consiguiente con el desarrollo de resistencia a esta hormona. Además de lo anterior, existen reportes que indican que la dieta rica en fibra reduce la glucosa sanguínea (White, 1996; Valiga y Fonseca, 1997).

La dieta tiene un papel muy importante en el tratamiento de la diabetes mellitus, sin embargo, en la mayoría de los casos es incapaz por sí sola de normalizar los disturbios en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas característicos de este padecimiento, por lo que se hace necesario recurrir a los medicamentos.

Se debe recurrir a los medicamentos hipoglucemiantes en todos aquellos casos de DM en los que la dieta y el ejercicio físico resulten insuficientes para normalizar la glucemia. Dentro de los medicamentos hipoglucemiantes se encuentra la insulina y los hipoglucemiantes orales: sulfonilureas, biguanidas y acarbose (Gómez-Pérez y Rull, 1997; Garcia-Garcia, 1997).

## **Medicamentos antidiabéticos**

Existen cuatro diferentes clases de medicamentos capaces de reducir los niveles de glucosa en sangre, los cuales son conocidos como agentes hipoglucemiantes: sulfonilureas, biguanidas y acarbose (en conjunto, mejor conocidos como hipoglucemiantes orales) y la insulina. Estas sustancias tienen diferentes mecanismos de acción, benefician a diferentes tipos de pacientes con DM y producen distintos efectos colaterales.

### *Sulfonilureas*

Las sulfonilureas fueron introducidas en la práctica médica a mediados de la década de 1950. Estos medicamentos producen varios efectos biológicos, algunos de los cuales no están completamente entendidos. De manera preponderante, se sabe que estimulan al páncreas para incrementar la producción de insulina, lo cual a su vez promueve el paso de la glucosa de la sangre a las células, reduciendo así los niveles de glucosa sanguínea (Gómez-Pérez y Rull, 1997). Sin embargo, después de varios meses los niveles sanguíneos de insulina regresan a los niveles que se tenían antes de la administración de estos medicamentos, manteniéndose aún reducidos los niveles de glucosa sanguínea. Es claro, por tanto, que las sulfonilureas tienen otros efectos, varios de los cuales han sido ya identificados. Así por ejemplo, la administración de sulfonilureas disminuye la velocidad a la cual el hígado libera glucosa al torrente sanguíneo; además, las sulfonilureas aumentan el número de receptores insulínicos sobre las membranas celulares, incrementando así la eficiencia de la insulina (Faber y col., 1990).

Las sulfonilureas están mejor indicadas para aquellos pacientes mayores de 30 años con DM tipo 2 que todavía tienen células  $\beta$  funcionales, que mantienen una glucosa sanguínea en ayunas menor de 250 mg/kg y que no usan insulina. No obstante, muchos pacientes diabéticos no pueden usar estos medicamentos. Algunos no responden a ellos, mientras que otros, aunque responden bien por varios años después dejan de responder. Las sulfonilureas finalmente son inefectivas en pacientes con pocas células  $\beta$  funcionales.

Las sulfonilureas están contraindicadas en la DM tipo 1, en el embarazo y la lactancia, cirugía mayor, trauma severo o estrés, antecedentes de reacciones alérgicas con medicamentos relacionados a las sulfonilureas (sulfonamidas, por ejemplo), predisposición a episodios de hipoglucemia grave, particularmente aquellos con enfermedad hepática o complicaciones renales graves. El efecto colateral más importante de las sulfonilureas es la hipoglucemia (Jenning y col., 1989), aunque pueden existir otros que dependen del tipo de sulfonilurea. Algunas pueden producir retención de agua y

descenso concomitante de la presión sanguínea; otras pueden causar pérdida de sodio e interferir con la función muscular. Pueden existir además interacciones peligrosas entre las sulfonilureas y otros medicamentos, tales como aspirina, alcohol, bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, esteroides y estrógenos, entre otros (Jackson, 1981; Gómez-Pérez y Rull, 1997).

### *Biguanidas*

La metformina y la fenformina son una clase de medicamentos que pertenece a la familia de compuestos conocidos como biguanidas. Estos medicamentos se han usado en Europa para tratar la DM tipo 1 desde finales de la década de 1950, sin embargo, en los Estados Unidos de Norteamérica la metformina fue aprobada apenas en 1994. Este medicamento reduce, usualmente, los niveles de glucosa sanguínea de un 25 a un 30 % (García-García, 1997).

Aunque estos fármacos se han usado desde hace ya algunos años, hasta ahora no se conoce con exactitud como reducen la glucosa sanguínea. La metformina reduce la liberación de glucosa hepática disminuyendo la gluconeogénesis; reduce la absorción de glucosa a nivel intestinal; en el músculo incrementa la glucólisis y al igual que las sulfonilureas, reduce la resistencia a la insulina aumentando la sensibilidad y número de receptores. Por otra parte, no estimula la secreción de insulina, no causa hipoglucemia y no produce aumento de peso (Bailey, 1989).

La metformina reduce exitosamente los niveles de glucosa sanguínea en aproximadamente el 80 % de los pacientes y debido a que no estimula la producción de insulina, no está relacionada con episodios de hipoglucemia (Jackson, 1986; Baliga, 1997).

Entre los efectos adversos que causan estos medicamentos se encuentra la acidosis láctica por lo que no se deben administrar a pacientes con insuficiencia renal, hepática y cardíaca. También pueden causar náuseas, vómito y diarrea (Katzung, 1996; García-García, 1997).

### *Acarbosa*

Un grupo especial de agentes de reciente adquisición son los inhibidores de  $\alpha$ glucosidasas que actúan en la luz del intestino evitando que los enterocitos absorban los monosacáridos que se obtienen de la digestión de los alimentos. La acarbosa, representante principal de estos medicamentos, disminuye las cifras de glucemia posprandial, el área bajo la curva glucémica, la glucosilación de la hemoglobina, la insulina posprandial y las concentraciones séricas de lípidos. Los síntomas colaterales de acarbosa

son dolor abdominal, diarrea y flatulencia. Además, su uso combinado con insulina o sulfonilureas aumenta la frecuencia de episodios de hipoglucemia (ANM, 1997)

### *Troglitazona*

La troglitazona, cuyo nombre comercial es Rezulin, fue recientemente aprobada por la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos de Norteamérica. Se espera que este fármaco permita eliminar, o al menos disminuir, las inyecciones de insulina para casi un millón de pacientes diabéticos (Tamnny-Antonucci y col., 1997). A diferencia de otros medicamentos para la DM tipo 2, Rezulin resensibiliza el organismo a la insulina. En la DM tipo 2 el páncreas produce insulina, pero las células no pueden usarla convenientemente para metabolizar la glucosa sanguínea. El mecanismo de acción preciso de Rezulin aún se desconoce, pero se creó que estimula un gen que impulsa la producción de proteínas especiales que trabajan con la insulina para movilizar la glucosa del torrente sanguíneo al interior de la célula. (Tan y Nelson, 1997). A pesar de lo anterior, Rezulin puede tener algunos riesgos. En roedores eleva el colesterol e incrementa el tamaño del corazón, aparentemente debido a la retención de fluido, incrementando el riesgo de hipertensión y enfermedades cardíacas. Además, se ha determinado que la administración de una dosis 47 veces superior a la dosis del humano en roedores, provoca aparición de tumores. Se desconoce si la droga incrementa el riesgo de contraer cáncer en el humano a dosis más bajas (White, 1996).

Aunque los medicamentos hipoglucemiantes se han usado ampliamente en el control de la DM, no se ha demostrado, de manera concluyente, que tengan un efecto protector a largo plazo contra las complicaciones cardiovasculares e inclusive se ha llegado a asegurar que aumentan la incidencia de éstas (Kolata, 1979). Los amplios efectos colaterales y las fallas secundarias que se presentan con la administración de los hipoglucemiantes orales, en muchos casos hace necesario administrar insulina (Jackson, 1986; Bell, 1990).

### Insulina

La insulina es el fármaco hipoglucemiante más efectivo hasta hoy conocido en el control de la DM. La insulina es una hormona constituida por 51 aminoácidos que se produce en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas. Esta hormona controla la captación de glucosa en las células del hígado, músculos y tejido adiposo. Cuando el páncreas no produce insulina es necesario administrarla por medio de inyecciones (Chenault, 1979).

La insulina comercial tradicionalmente se obtiene del páncreas bovino o porcino y en la actualidad es posible también producir insulina humana por medio de la técnica de ADN

recombinante. Este procedimiento consiste en insertar en bacterias o levaduras, la información genética para elaborar insulina o su precursor, proinsulina.

La insulina producida utilizando esta técnica es semejante en su estructura química a la que se produce en el páncreas humano (Chance y Frank,1993).

La concentración de las preparaciones comerciales de insulina está referida a la cantidad de unidades que contiene un mililitro. En la actualidad la insulina U-100 (100 42 unidades por mililitro) es la de mayor uso. En relación a su farmacocinética y farmacodinamia (absorción y duración de su efecto), las preparaciones comerciales de insulina se pueden clasificar en tres tipos: insulina de acción rápida, insulina de acción intermedia e insulina de acción prolongada. Cada preparación de insulina tienen un comportamiento particular en relación al inicio, al tiempo de máximo efecto y a la duración de su actividad (Zinman, 1993; Heinemann y Richter, 1993).

La insulina de acción rápida incluye a la insulina Regular (R), también llamada rápida y su análogo Lyspro (White y col., 1996). La insulina de acción intermedia presenta dos variantes: insulina Lenta (L) y la insulina NPH (N). La insulina de acción prolongada también presenta dos variantes: la insulina ultralenta (UL) y la insulina PZI. Existen también mezclas de insulina de acción rápida e intermedia en diferentes proporciones (30/70 ó 20/80).

A la insulina se debe recurrir en todos los casos de DM tipo 1, para el control de pacientes con DM tipo 2 durante el embarazo e intervenciones quirúrgicas y cuando los hipoglucemiantes orales son insuficientes. Entre los efectos adversos a la insulina encontramos la hipoglucemia (Clarke y col., 1996), el síndrome de sobre insulinización crónica, lipoatrofia en el lugar de las inyecciones, reacciones alérgicas e insulinoresistencia. Estas dos últimas se han visto disminuidas con el uso reciente de la insulina humana (Koivisto, 1993; Rojas-Morales y Altamirano-Arreguín, 1994).

El descubrimiento de la insulina (Banting y Best, 1921) fue un paso trascendental en el tratamiento de la DM y hasta hoy día, es el descubrimiento más importante en este campo. Aunque indudablemente su utilización ha permitido aumentar considerablemente la sobrevivencia de los pacientes diabéticos, la terapia insulínica no siempre puede evitar el desarrollo de las complicaciones vasculares y muchas veces, por su administración necesariamente parenteral, llega a producir en los pacientes reacciones imprevistas.



## Desarrollo de fármacos

Tras el largo proceso de descubrimiento de un fármaco (identificación de un objetivo y validación de un candidato a medicamento), aún queda mucho para que el proceso de desarrollo de un fármaco esté completo. El desarrollo de un fármaco engloba su seguridad, eficacia, formulación y fabricación. Normalmente, los estudios de seguridad comienzan con diversos experimentos denominados estudios preclínicos. Cuando estos estudios prevén que el candidato a medicamento es seguro, se inicia su evaluación en seres humanos en una serie de estudios conocidos como ensayos clínicos. (Amgen España, 2013)

### Estudios preclínicos

Los estudios preclínicos son pruebas que se llevan a cabo en un contexto científicamente controlado con utilización de cultivos celulares y animales como modelos. La finalidad de los estudios preclínicos es predecir cómo actúa el organismo sobre el candidato a fármaco (farmacocinética), cómo actúa el candidato a fármaco sobre el organismo (farmacodinamia) y si el candidato a fármaco puede entrañar posibles riesgos para la salud o efectos secundarios tóxicos. (Amgen España, 2013)

Los análisis farmacocinéticos aportan datos para responder preguntas tales como: ¿Cómo se absorbe y transporta el fármaco? ¿Qué células y órganos resultan afectados? ¿Qué enzimas del organismo degradan el medicamento y con qué rapidez? ¿Cómo se elimina el medicamento o sus metabolitos (productos de degradación) del organismo? En los estudios farmacodinámicos se analizan los efectos dosis-respuesta y, a menudo, se controlan los cambios bioquímicos y fisiológicos (como actividades enzimáticas, frecuencia cardíaca, presión arterial y temperatura corporal) en los sujetos evaluados. Los análisis farmacodinámicos, que revelan lo que hace el organismo en respuesta al fármaco, se utilizan para responder a la pregunta: ¿resulta el fármaco perjudicial o tóxico para las células o sistemas orgánicos? En los estudios toxicológicos se aborda el potencial de que el fármaco o sus metabolitos destruyan o lesionen células y órganos, causen cáncer u ocasionen problemas relacionados con la reproducción, como defectos congénitos o esterilidad. Los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos se utilizan en conjunto para alcanzar el objetivo de los estudios preclínicos, lo que permite responder a la pregunta: ¿resulta seguro el fármaco? En Europa, los estudios preclínicos deben llevarse a cabo siguiendo las directrices de Buenas Prácticas de Laboratorio. En otras partes del mundo también se siguen unas normas internacionales armonizadas. (Amgen España, 2013)

La información derivada de estos estudios es vital. Permite que los investigadores calculen una posología segura para los seres humanos en ensayos clínicos en fase I. Aunque se exige que las empresas farmacéuticas presenten datos de modelos animales a las autoridades sanitarias como parte del proceso de aprobación de medicamentos, las empresas están adoptando medidas para reducir el número de animales utilizados en los estudios debido a problemas éticos y al coste que conllevan las instalaciones.

Los modelos animales incrementan en gran medida la capacidad de los científicos de estudiar la eficacia y la seguridad de los candidatos a medicamentos nuevos. En la validación de objetivos, los investigadores pueden utilizar ratones con genes desactivados (knock-out) o activados (knock-in). A los ratones con genes desactivados se les altera genéticamente para eliminar las versiones murinas de genes responsables de enfermedades humanas. Estos genes también pueden activarse para crear modelos murinos de enfermedades humanas como cáncer, diabetes, Alzheimer y Parkinson. Los candidatos a medicamentos se analizan en estos ratones, lo que permite que los investigadores comprueben la aparición de efectos adversos secundarios antes de administrarlos a seres humanos.

Inicialmente, muchos estudios de seguridad y toxicidad de fármacos se realizan en cultivos celulares. Las líneas celulares se obtienen mediante ingeniería genética para expresar genes que, a menudo, son responsables de reacciones adversas. La creación de modelos de líneas celulares ha disminuido el número de animales necesarios para los estudios (con la consiguiente reducción del coste y el tiempo) y contribuye a acelerar el proceso de desarrollo de medicamentos.

Cuando los ensayos preclínicos aportan pruebas suficientes de que un candidato a fármaco es seguro, las empresas presentan una solicitud de Fármaco nuevo en investigación (IND) a la EMEA. Una vez que la EMEA aprueba el IND, las empresas pueden comenzar a realizar ensayos clínicos escalonados en seres humanos. (Amgen España, 2013)

## Ensayos clínicos

Los ensayos clínicos son pruebas diseñadas para determinar la seguridad, la posología adecuada, la eficacia, las reacciones adversas y los efectos del uso a largo plazo de un medicamento nuevo en seres humanos. Los ensayos clínicos que se llevan a cabo en seres humanos se realizan siguiendo normas armonizadas internacionales, como las directrices de Buenas prácticas clínicas (BPC) de la EMEA, que protege los derechos y garantiza la

seguridad de los sujetos humanos evaluados y sigue el código ético para la investigación en seres humanos.

Los ensayos clínicos se realizan en tres fases sucesivas, I, II y III, y en cada fase se evalúa un número progresivamente mayor de seres humanos. Cada fase tiene una finalidad diferente y contribuye a que los investigadores respondan distintas preguntas. Cuando una fase tiene éxito, el candidato a medicamento pasa a la siguiente fase. Cuando resulta infructuosa, se detienen los ensayos clínicos, se suspende el desarrollo del fármaco y la empresa promotora regresa a la fase de descubrimiento para buscar otro candidato a fármaco.

Los ensayos clínicos se llevan a cabo en diferentes centros de estudio. Se tardan varios años en completar las tres fases de un ensayo clínico.

Normalmente, los ensayos clínicos son dirigidos por una organización de investigación por contrato (CRO), que es una organización independiente. La CRO se encarga de toda la gestión y comunicación de datos entre la empresa promotora y los médicos que supervisan los ensayos clínicos. La CRO también se cerciora de que los voluntarios participantes en el estudio entienden y aceptan los riesgos que entrañan los ensayos clínicos y que se observan las normas de BPC. (Amgen España, 2013)

#### Fase I

Los ensayos en fase I representan la primera vez que se estudia un fármaco nuevo en investigación en seres humanos. El propósito consiste en evaluar la seguridad, la tolerabilidad y el intervalo posológico seguro del medicamento. El grupo experimental suele ser pequeño, de modo que oscila entre 20 y 50 voluntarios. Normalmente se trata de voluntarios sanos que no padecen la enfermedad.

Sin embargo, en ocasiones, en un ensayo clínico en fase I se acepta la intervención de pacientes voluntarios, especialmente al analizar tratamientos oncológicos. Lo habitual es que en estos pacientes hayan fracasado los tratamientos disponibles o que cuenten con pocas opciones terapéuticas o bien que los posibles efectos secundarios del medicamento sean demasiado arriesgados para que participen personas sanas (como al utilizar algunos quimioterápicos). (Amgen España, 2013)

#### Fase II

La finalidad de los ensayos en fase II es determinar la eficacia y la seguridad del medicamento nuevo en investigación en un grupo más amplio de pacientes voluntarios, normalmente entre 100 y 300 personas. Un paciente voluntario es alguien que padece la enfermedad para cuyo tratamiento está destinado el medicamento. Algunas empresas dividen los ensayos en fase II en fase IIA (para evaluar la posología) y fase IIB (para evaluar la eficacia). La mayor parte de los medicamentos nuevos en investigación fracasan durante esta etapa debido a problemas de eficacia o seguridad. (Amgen España, 2013)

### Fase III

La finalidad de los ensayos en fase III es confirmar la eficacia del medicamento nuevo en investigación y compararla con placebo o tratamientos ya comercializados. Con este propósito se estudia a cientos o miles de pacientes voluntarios. Los ensayos en fase III son los más costosos y los que requieren más tiempo, de modo que duran un par de años o más para determinar la seguridad a largo plazo.

Una vez que finaliza con éxito la fase III, la empresa promotora presenta una solicitud de fármaco o producto biológico nuevo a las autoridades sanitarias. En Europa, la empresa presentaría una solicitud de fármaco nuevo (NDA) para un medicamento de molécula pequeña o una solicitud de autorización de producto biológico (BLA) para un fármaco de molécula más grande a la EMEA. Si el organismo regulador (la EMEA en Europa o la FDA en los Estados Unidos) aprueba el uso del medicamento, se permite que la empresa promotora comercialice y venda el producto en el país o los países regulados por dicha autoridad. La fabricación final del fármaco, o producción a gran escala, debe tener lugar en una instalación que cumpla las normas estrictas del país, como las Normas para la Correcta Fabricación (NCF) de la EMEA o las Buenas Prácticas de Fabricación (cGMP) de la FDA, a fin de garantizar la seguridad y la pureza del producto. (Amgen España, 2013)

### Fase IV

Los ensayos en fase IV se llevan a cabo una vez que se comercializa un fármaco aprobado. Un objetivo es vigilar la seguridad y la eficacia del fármaco cuando se utiliza en un contexto médico normal en una población de pacientes que podría ascender a varios millones. En ocasiones se descubren reacciones adversas, que no se observaron en una cohorte de pacientes comparativamente pequeña (3.000 pacientes voluntarios en comparación con millones), en poblaciones más amplias y diversas. Si se descubre una reacción adversa, es posible que se retire el fármaco del mercado. La empresa promotora puede retirar voluntariamente el medicamento o un organismo regulador puede retirarlo

del mercado. Tras efectuar nuevos estudios, cabe la posibilidad de volver a incorporar el fármaco.

En promedio, se tarda entre 10 y 15 años en completar las distintas etapas de la fase de desarrollo de un producto (pipeline). La mayoría de los medicamentos en investigación no lo consiguen. De cada 1.000 posibles medicamentos nuevos en descubrimiento, tan sólo uno alcanzará la autorización.

En su caso, como una posibilidad sujeta a los estudios clínicos correspondientes, el medicamento mencionado podría llegar a prescribirse como una alternativa al uso de insulina y los antidiabéticos orales. También podría ser útil en la prediabetes y el síndrome metabólico como preventivo. (Amgen España, 2013)

## ***Tillandsia usneoides***

Sinónimos: Standley y Steyermark (1958) mencionan como sinónimos a *Renalmia usneoides* L.; *Dendropogon usneoides* Raf. y *Strepsia usneoides* Steud.

Otros nombre comunes usados en español: Heno (Rzedowski y Rzedowski, 2001), musgo (Standley y Steyermark, 1958), barba española, pañal de niño (Martínez, 1979), barba de viejo.

Nombres comunes en idiomas indígenas de México: Cuampach (dialecto náhuatl), ucuhui'qui (lengua totonaca), guie-guie, guijxhicuij-lace, guixi-guillace, guixi-niño, quia-quiye, quie-quiye (lengua zapoteca), lo-pash-i (lengua chontal), me'ex-nuxib (lengua maya), patzueni tacari (lengua tarasca), tzonté (lengua tzotzil) y cúthey (lengua huasteca) (Martínez, 1979), paxtle, pashtle, paixte. Pastle y paxtle.

Nombres comunes en inglés: Spanish moss, air plant, Florida moss, grandfather's whiskers, long moss, old man's beard.

### **Categorías taxonómicas superiores**

Reino: Plantae;

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas);

División: Magnoliophyta (plantas con flor);

Clase: Liliopsida (monocotiledóneas);

Subclase: Zingiberidae;

Orden: Bromeliales.

### **Origen y distribución geográfica**

Área de origen: Desde Estados Unidos, por todo el continente americano (Standley y Steyermark, 1958).

Distribución secundaria: Islas del Pacífico; en algunas se considera invasiva. En la Flora de Norteamérica se encuentra un mapa de distribución.

Distribución en México: En Tropicós se citan ejemplares de Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán.

Estatus migratorio en México: Nativa.

*Tillandsia usneoides* es una hierba grisácea, de tallos colgantes de un soporte (epífita), de hasta 8 metros de largo en forma de hebras muy delgadas (menos de 1 mm de grosor), sin raíces, con inflorescencias aparentemente laterales, reducidas a una sola flor prácticamente sésil, acompañada de una bráctea más corta que los sépalos, ovada, puntiaguda, cubierta de escamas. En las flores el cáliz de 3 sépalos unidos en la base, ovados, puntiagudos, de hasta 7 mm de largo, delgados, sin pelillos; la corola de 3 pétalos angostos, de hasta 11 mm de largo, de color verde pálido o azul; los estambres 6, ocultos por los pétalos, más largos que el estilo. Sus hojas son sumamente angostas (filiformes), con la base (vaina) más ancha, algo curvadas, de hasta 5 cm de largo (generalmente más cortas), con la superficie densamente escamosa. El fruto es una cápsula de hasta 2.5 cm de largo, cilíndrica y abruptamente terminada en un pico corto, en la madurez se abre para liberar las semillas, éstas son angostas, más o menos cilíndricas, con un apéndice plumoso en la base. La planta es una epífita, o sea, usa otras plantas como soporte. No es una parásita - no absorbe nutrientes o agua de su patrón. Obtiene agua y alimento de sus alrededores: tiene escamas especiales en la superficie que pueden captar humedad, tanto de la lluvia, como de aire húmedo. Además capta polvo y de esto se alimenta. Se puede confundir con algunos líquenes, pero éstos tienen tallos más delgados, y carecen de flores y frutos.

### **Hábitat**

Como epífita en diversos tipos de bosques, generalmente en habitats de alta humedad (Rzedowski y Rzedowski, 2001), también en el paisaje cultural si hay soportes como cercas.

### **Distribución por tipo de zonas bioclimáticas**

Bosque de pino-encino, bosque mesófilo, selva baja caducifolia, ocasionalmente en matorral xerófilo (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Si crece en sitios con baja precipitación generalmente es un indicador de flujos de aire húmedos, frecuentemente nocturnos.

### **Usos**

La planta se utiliza con fines ornamentales en festividades religiosas, especialmente en los “nacimientos” y otros adornos navideños (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Se comercializa a escala grande en la temporada navideña en los mercados de México; las plantas provienen de la recolecta de poblaciones silvestres. Además tiene usos medicinales.

Anteriormente se usaba para rellenar alfombras y colchones, incluso asientos de coches, y para hacer cuerdas después de un proceso de enriado. En E.U.A. fue la base de toda una industria durante más de 200 años. Se puede usar para tallar trastes. Ocasionalmente se da a animales como forraje. Se puede utilizar para empaque; hasta se ha llegado a cultivar para este fin. También sirve para arropo de cultivos.

Muchas personas tienen algunas plantas de heno en su jardín o su casa como ornamental. En algunos países occidentales se comercializa como novedad.

### **Química**

Poco se conoce sobre la composición química de esta planta. De los tallos con hojas se ha aislado el flavonoide 4'-5-7-trihidroxi-3-3'-5'-6-tetrametoxi-flavona. Se ha detectado la presencia de fenoles, esteroides y triterpenos en las ramas.

### **Farmacología**

La actividad hipoglucémica de un extracto acuoso de la planta se ha demostrado aplicado en ratas por vía intragástrica a dosis de 125, 250 y 500mg/kg.

Un extracto etanólico de hojas mostró actividad analgésica aplicada en ratones por la vía intragástrica.

A pesar de haberse obtenido una respuesta positiva con extractos acuosos de la planta en relación con efectos androgénico y estrogénico, evaluados en ratas machos castrados para la primera acción, y ratas hembras para la segunda, ambas por vía intraperitoneal, sin embargo, ninguna de estas actividades ha sido explicada bioquímicamente. Los resultados

no son concluyentes por lo escaso de los datos, pobre diseño experimental y falta de análisis estadístico de los datos experimentales.

Otra acción evaluada, pero que dio resultados negativos fue el efecto reductor de la presión infraocular de un extracto acuoso que fue evaluado en conejos por vía intravenosa.



## VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

### Obtención de extracto acuoso de *Tillandsia usneoides*

Se obtuvo *Tillandsia usneoides* comprándolo de mercados populares en el mes de Diciembre. Se utilizó la planta completa, se lavó, y por cada 30g de *Tillandsia usneoides* se adiciono 1L de agua. Se dejó ebulir durante 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó en charolas, en donde se dejó evaporar a sequedad, y el residuo fue recuperado para las pruebas posteriores. Esta metodología fue estandarizada por la Dra. Escobar en el 2005.

### Estudio agudo en ratones de la cepa CD1

Se realizaron dos estudios agudos en ratones utilizando diferentes dosis de extracto acuoso de *Tillandsia usneoides*. Se trabajó con ratones cepa CD1, de sexo masculino, de mes y medio de edad, de 25 a 35 g de peso corporal mantenidos con alimentación <sup>®</sup>Purina y agua *ad libitum*. Se usaron 4 grupos de 5 ratones cada uno, a los cuales, previo ayuno de 18 horas, se les determinó la glucemia (tiempo cero). Se procedió a administrar las dosis de extracto acuoso de *Tillandsia usneoides*. Las dosis administradas del extracto fueron de 100 mg/kg, 250mg/Kg y 500mg/Kg de peso corporal con una administración vía intraperitoneal. Se hicieron determinaciones de glucosa en sangre en los minutos 180 y 300 después de la administración del extracto acuoso de *Tillandsia usneoides*. La cuantificación de la glucosa sanguínea se llevó a cabo mediante tiras reactivas ACCU-CHEK Performa test en el Reflolux II de Boehringer-Mannheim.

El segundo estudio agudo fue realizado aplicando 3 diferentes concentraciones de extracto de 25 mg/kg, 50mg/Kg y 100mg/Kg de peso corporal con una administración via intraperitoneal. Se les determinó la glucemia (tiempo cero), previo ayuno de 18 horas. Se hicieron determinaciones de glucosa en sangre en los minutos 120, 240 y 360 después de la administración del extracto acuoso de *Tillandsia usneoides*. La cuantificación de glucosa fue por el método anteriormente señalado.

### Estudio crónico en ratones de la cepa CD1

El estudio crónico se realizó en ratones normo glucémicos. Se utilizaron dos dosis diferentes 50mg/Kg de peso y 100mg/Kg de peso, vía intragástrica. El estudio tuvo una duración de 20 días. Se hicieron análisis bioquímicos y Western Blot.

### Determinación del contenido de proteína por método de Lowry (Lowry, 1951)

El contenido de proteína en las muestras se determinó por el método de Lowry, con el reactivo de Folin-Ciocaltean (Bio Rad). Se tomó una alícuota de 10  $\mu$ l de las muestras y se le agregó 990 $\mu$ l de agua destilada, mas 5ml de solución C y finalmente 500 $\mu$ l del reactivo Folin (1:1) y fue incubado 30 min a 25°C, la cuantificación se realizó con una curva patrón de albúmina sérica bovina en un rango de 0.1 a 0.5 mg/ml. Posteriormente se leyó la absorbancia a 750nm y se determinará la concentración de proteína total citoplásmica.

### Análisis por Western Blot (WT)

El ensayo de WT por el método de Preston, 1996, se basa en la identificación de la proteína citoplasmática por medio de la unión específica con el anticuerpo primario (HMGB1 y  $\alpha$ -actina) con una dilución 1:500 (Santa Cruz, Biotechnology), durante 1 h. El reconocimiento de éste fue realizado por un segundo anticuerpo acoplado a la peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) 1:10000 por 1h, la membrana se lavó con TBS-Tween20 durante 10 min por triplicado y 5 min con TBS. Finalmente la membrana fue tratada con el ensayo SuperSignal® West Picp Substrate (Pierce, Chem, Co.) durante 10 min y los resultados fueron visualizados en un densitómetro GS670 (Kodak) (Anexos, 3. Metodología de Western Blot)

### Análisis por Oxy Blot (OB)

En el ensayo de OB, se determina la proteína citoplasmática que fue oxidada, se adicionó a los geles un estándar, para evaluar los niveles de oxidación.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados primero se hizo una prueba de homocedasticidad, homogeneidad o similaridad de varianzas, es una de las propiedades más importantes para algunos de los métodos inferenciales paramétricos, como los modelos de análisis de varianza (ANOVA). Su gran importancia radica en que es una de las principales propiedades de bondad de ajuste que un conjunto de datos debe poseer para poder ser analizado con un determinado modelo estadístico. El no cumplimiento de esta propiedad puede conllevar que las conclusiones que se extraigan del modelo sean falsas. Se demostró que si hay similaridad de varianzas, por lo cual, después se procedió con una prueba ANOVA. El objetivo principal de este experimento consistió en determinar el

efecto que sobre alguna variable dependiente Y, en este caso fueron, el colesterol, los triglicéridos y las transaminasas Aspartato transaminasa (AST) y Alanina transaminasa (ALT); tienen distintos niveles de algún factor X (variable independiente y discreta), que en este caso, fueron los diferentes ratones en sus respectivos grupos. Seguido por la prueba de Tukey y Duncan, para encontrar diferencias significativas en los grupos administrados con las diferentes dosis de *Tillandsia usneoides* y Glibenclamida, el control positivo, con respecto al control. El análisis fue realizado con el programa SPSS y un nivel de significancia del 95%.

## IX. RESULTADOS

Al terminar la duración del estudio crónico, los animales se sacrificaron para obtener sangre y medir los siguientes parámetros bioquímicos: colesterol, triglicéridos, las transaminasas Aspartato transaminasa (AST) y Alanina transaminasa (ALT).

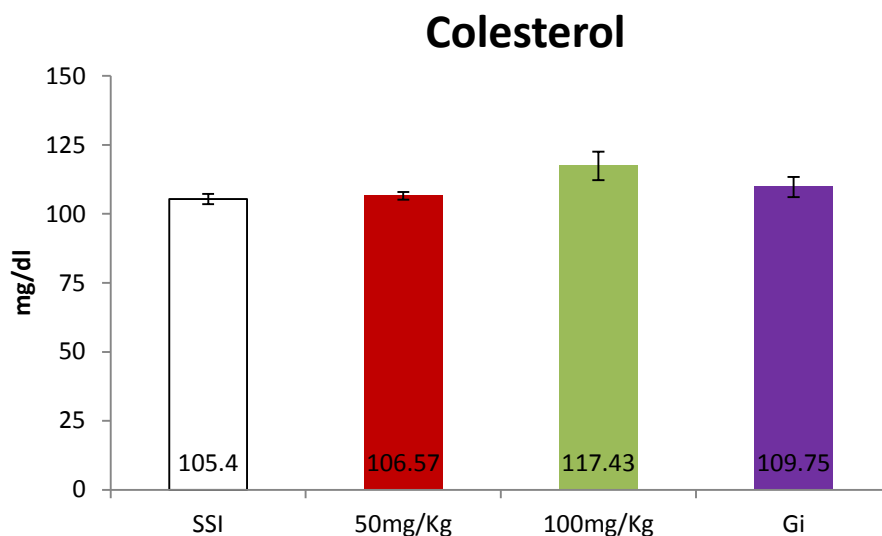


Grafico 1. Niveles de colesterol (mg/dl) en los grupos tratados solución salina isotónica (SSI), con extracto de *Tillandsia usneoides* (50mg/Kg y 100/mg/Kg) y Glibenclamida (Gi) (5mg/Kg).

En el caso del colesterol al evaluarse con el programa estadístico SPSS. Se realizó una prueba de homocedasticidad o similaridad de varianzas, y ANOVA, cumpliendo estas prueba paramétricas, se realizó prueba de Tukey y Duncan. No se encontró diferencia significativa al relacionar el control, solución salina isotónica (SSI) con los grupos tratados con el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* y Glibenclamida, al evaluarlos con la prueba de Tukey y con la de Duncan. Eso quiere decir, que el extracto de *Tillandsia usneoides* con las dosis de 50mg/kg y 100mg/kg no elevaron los niveles de colesterol en sangre al compararlas con el control, que fue solución salina.

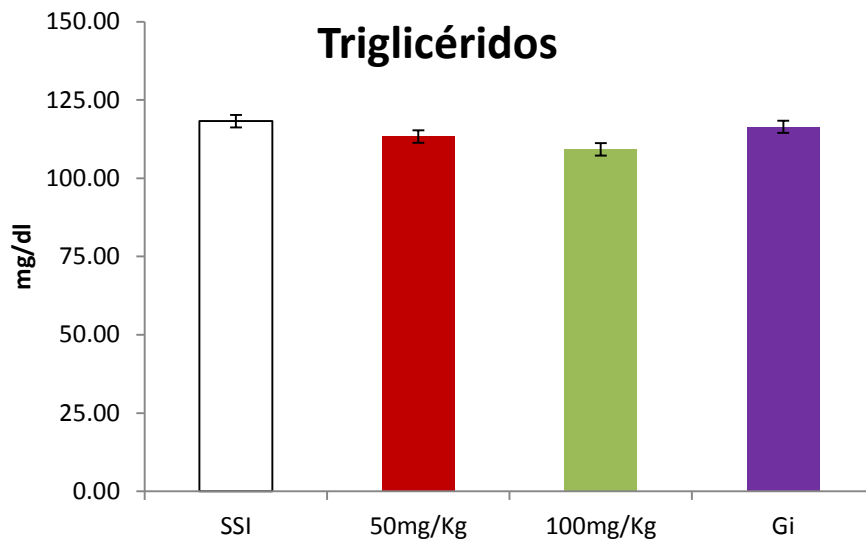


Grafico 2. Niveles de triglicéridos (mg/dl) en los grupos tratados con solución salina isotónica (SSI), extracto de *Tillandsia usneoides* (50mg/Kg y 100/mg/Kg) y Glibenclamida (Gi, 5mg/kg).

Al evaluar los niveles de triglicéridos con el programa estadístico SPSS, se realizó una prueba de homocedasticidad o similaridad de varianzas, y ANOVA, cumpliendo estas prueba paramétricas, se realizó prueba de Tukey y Duncan. No se encontró diferencia significativa al relacionar el control, (SSI) con los grupos tratados con el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* y Glibenclamida, al evaluarlos con la prueba de Tukey y con la de Duncan. Eso quiere decir, que al administrar el extracto de *Tillandsia usneoides* con las dosis de 50mg/kg y 100mg/kg los niveles de triglicéridos en sangre no tienen un variación significativa al compararlas con el control.

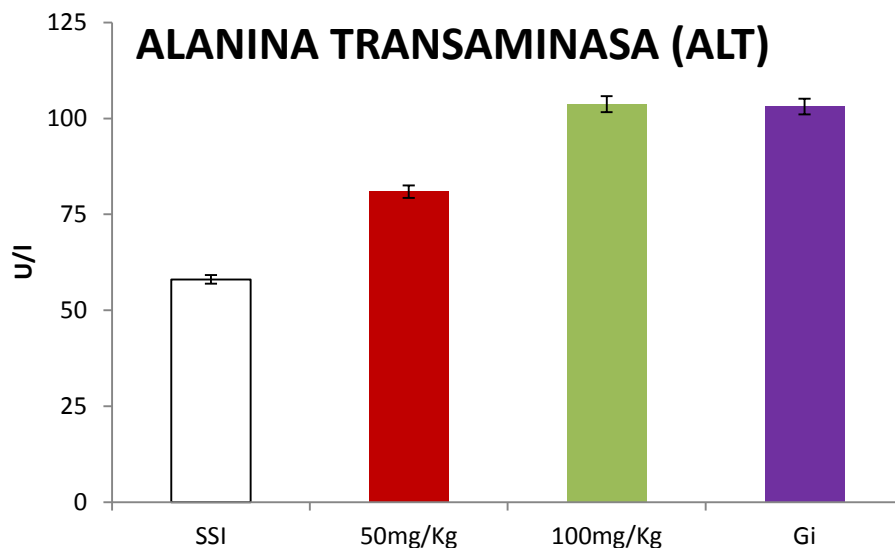


Grafico 3. Niveles de ALT (u/l: Unidad de actividad enzimática/litro) en los grupos tratados con solución salina isotónica (SSI), extracto de *Tillandsia usneoides* (50mg/Kg y 100/mg/Kg) y Glibenclamida (Gi 5mg/kg).

Al evaluar los niveles de la transaminasa ALT con el programa estadístico SPSS, se realizó una prueba de homocedasticidad o similaridad de varianzas, y ANOVA, cumpliendo estas prueba paramétricas, se realizó prueba de Tukey y Duncan. No se encontró diferencia significativa al relacionar el control, (SSI) con los grupos tratados con el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* y Glibenclamida, al evaluarlos con la prueba de Tukey y con la de Duncan.

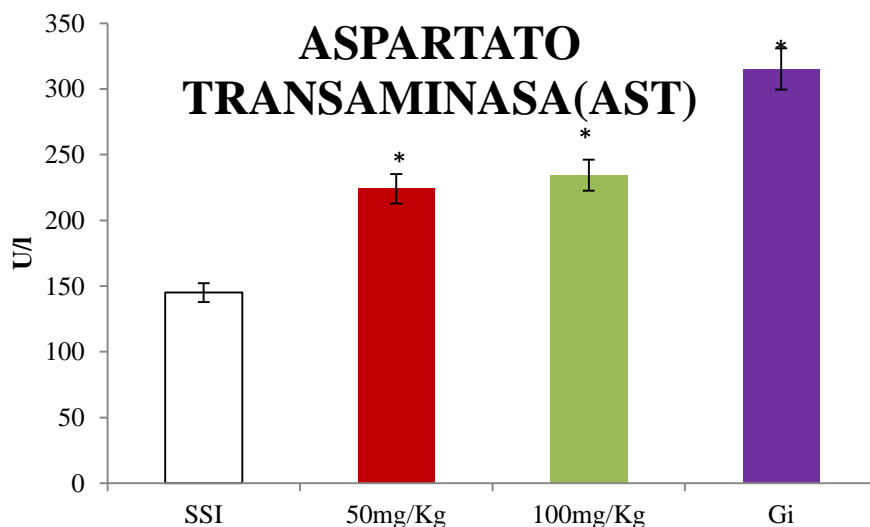


Grafico 4. Niveles de AST (u/l: Unidad de actividad enzimática/litro) en los grupos tratados con solución salina isotónica (SSI), extracto de *Tillandsia usneoides* (50mg/Kg y 100/mg/Kg) y Glibenclamida (Gi 5mg/kg).

Al evaluar los niveles de la transaminasa AST con el programa estadístico SPSS, se realizó una prueba de homocedasticidad o similaridad de varianzas, y ANOVA, cumpliendo estas prueba paramétricas, se realizó prueba de Tukey y Duncan. Se encontró diferencia significativa entre glibenclamida y el control con la prueba de Tukey. Y también se encontró diferencia significativa con el control entre los extractos de 50mg/kg, 100mg/kg y glibenclamida al realizar la prueba de Duncan

La ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos.

Por lo que no es un parámetro determinante para concluir que ocasionó un daño hepático.

Después de realizar las pruebas para determinar los parámetros bioquímicos, se hizo un Oxyblot, para determinar los niveles de proteína oxidada en plasma en los diferentes grupos tratados con solución salina isotónica (SSI), extracto de *Tillandsia usneoides* en concentraciones de 50mg/kg y 100mg/kg, y Glibenclamida 5mg/kg.

C5    50    100    Gb  
       R5    R5    R5

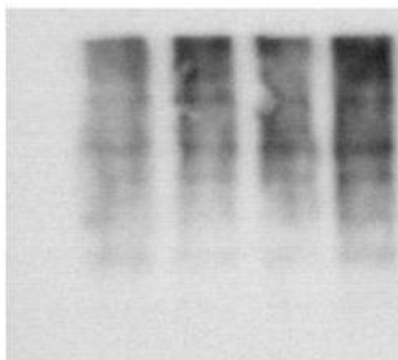


Figura 1. Gel de Oxiblot, C5, es el ratón 5 del grupo SSI; 50 R5 es el ratón 5 de grupo tratado con 50mg/kg de *Tillandsia usneoides*, 100R5, es el ratón 5 del grupo tratado en 100mg/kg de *Tillandsia usneoides*; y Gb R5 es el ratón 5 del grupo administrado con Glibenclamida

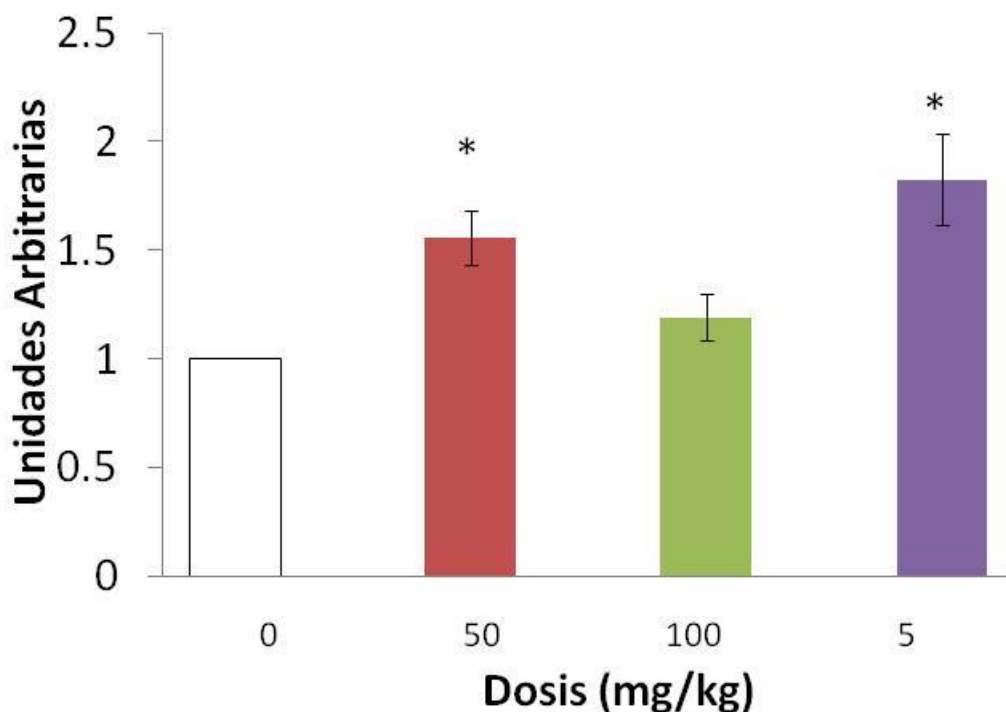


Gráfico 5. Niveles de oxidación en plasma en los grupos tratados con extracto de *Tillandsia usneoides* (50mg/Kg y 100/mg/Kg) y Glibenclamida (5mg/Kg).

El gel que se muestra en la figura 1, fue evaluado con el programa ImageJ, con el cual se obtuvo la densitometría de cada grupo. Arrojó resultados de medias, error estándar y desviación estándar, con lo cual se pudo hacer un análisis estadístico en el programa SPSS, una prueba de ANOVA y una prueba de Tukey.

La prueba de Tukey nos muestra que hay diferencia significativa de entre la dosis de 50mg/kg de *Tillandsia usneoides* y Glibenclamida (5mg/kg) al compararlas con el control (SSI). Al ser densidad de un gel de corrida, no tiene unidades cuantitativas, por lo cual se toma al control (SSI) como unidad, razón por la cual se le llaman unidades arbitrarias.



Esto significa que hubo una mayor oxidación en el grupo de que fue administrado con 50mg/kg de *Tillandsia usneoides* y Glibenclamida. Mientras que con la dosis de 100mg/kg no hubo diferencia significativa.

		Tiempo 0		T2
<b>Dosis</b>	Glibenclamida (5mg/kg)	0 min	30 días	
<b>Grupo 1</b>	Peso corporal (g)	Glucosa (mg/ml)		
<b>1</b>	37	77	54	
<b>2</b>	36	83	69	
<b>3</b>	37	60	69	
<b>4</b>	37	56	56	
<b>5</b>	36	90	48	
<b>Promedio</b>	36.60	73.20	59.20	
<b>Desviación estándar</b>		14.69	9.42	
<b>Error estándar</b>		6.57	4.21	
50mg/kg				
<b>Grupo 2</b>				
<b>1</b>	33	58	52	
<b>2</b>	33	81	66	
<b>3</b>	33	80	25	
<b>4</b>	36	56	37	
<b>5</b>	36	64	58	
<b>Promedio</b>	34.20	67.80	47.60	
<b>Desviación estándar</b>		11.97	16.50	
<b>Error estándar</b>		5.35	7.38	
100mg/kg				
<b>Grupo 3</b>				
<b>1</b>	36	53	24	
<b>2</b>	35	78	41	
<b>3</b>	35	59	37	
<b>4</b>	36	70	33	
<b>5</b>	37	73	60	
<b>Promedio</b>	35.8	66.6	39	
<b>Desviación estándar</b>		10.31	13.32	
<b>Error estándar</b>		4.61	5.96	
Solución salina				

<b>Grupo 4</b>			
<b>1</b>	36	67	68
<b>2</b>	35	65	49
<b>3</b>	35	62	50
<b>4</b>	32	63	67
<b>5</b>	33	73	77
<b>Promedio</b>	34.2	66	62.2
<b>Desviación estándar</b>		4.36	12.24
<b>Error estándar</b>		1.95	5.47

Se muestra una mayor disminución de las glucemia en la dosis de 100mg/kg de extracto de *Tillandsia usneoides*, que en la dosis de 50mg/kg.

## **X CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

El extracto de *Tillandsia usneoides* en dosis de 50 mg/kg de peso en ratón, administrado vía intragástrica en un periodo de 30 días, no mostró actividad antioxidante en plasma. Sin embargo, los niveles de glucosa disminuyeron, al término de ese periodo, confirmando que *Tillandsia usneoides* tiene un efecto hipoglucemiante.

El extracto de *Tillandsia usneoides* en dosis de 100 mg/kg de peso en ratón, administrado vía intragástrica en un periodo de 30 días, no mostró una gran actividad antioxidante en plasma. Redujo las glucemias en mayor medida que la dosis de 50mg/kg.

En los estudios agudos en la dosis de 100mg/kg, se demostró cierta toxicidad, ya que algunos ratones quedaron ciegos. Se recomienda hacer más estudios, para encontrar la dosis letal mínima, ya que esta planta es de uso en medicina tradicional y puede ocasionar daños a la comunidad que la utiliza, al intentar reforzar el uso de medicamentos antidiabéticos.(Anexos 1.Estudio agudo, para determinar las dosis empleadas en el estudio cronico)

Se recomienda hacer más estudios en ratones con diabetes química, para poder comparar el efecto hipoglucemiante en ratones sanos y en ratones diabéticos.

## XI Bibliografía

Amgen España. (22 de Enero de 2013). *Amgen*. Recuperado el 13 de Marzo de 2013, de [http://www.amgen.es/doc3.php?op=profesionales\\_medicos2&ap=biotecnologia&sub=bio6](http://www.amgen.es/doc3.php?op=profesionales_medicos2&ap=biotecnologia&sub=bio6)

ANM (Academia Nacional de Medicina, México). (1997). Hipoglucemiantes de acción intestinal. Revisones Bibliográficas para el Médico General. 2 (4) : 37 - 39.

Baliga BS y Fonseca VA. (1997). Recent advances in the treatment of type I1 diabetes mellitus. *American Farm Physician* 55 : 817 - 824.

Bailey J y Day C.(1989). Traditional plant medicines treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-554.

Baliga BS y Fonseca VA. (1997). Recent advances in the treatment of type I1 diabetes mellitus. *American Farm Physician* 55 : 817 - 824.

Brennan A. (1996). Diabetes Mellitus : Biomedical health education promotion approach. *British J Nurs* 5 (17) : 1060 - 1064.

Faber, OK, Beck-Nielsen H, Binder L. (1990). Acute actions of sulphonylurea drugs during long term treatment of NIDDM. *Diabetes Care* 13 : 26 - 31.

García-García E. (1997). Biguanidas. En tratado de diabetología de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición (México) pp. 486 - 496.

Gómez-Pérez FJ y Rull JA. (1997). Sulfonilureas. En tratado de Diabetología de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición (México). pp. 471 - 482.

Gulias-Herrero A y Contreras-Rodriguez JC. (1997). Transplante de páncreas. En tratado de Diabetología de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de Nutrición (México). pp. 561 - 571.

Jackson EW. (1986). Guía profesional de medicamentos. Ed. El Manual Moderno.

Katzung GB. (1996). Farmacología Básica y Clínica. VI. Ed. El Manual Moderno. pp. 773 - 794.

Kennedy L. (1992). Glycation of hemoglobin and serum proteins. In : International Textbook of diabetes mellitus. Edited by Alberti M, Defionzo R, Keen H and Zimmet P. John Wiley & Sons. England. pp. 985-1007.

- Kolata GB. (1979). Diabetes drugs: clinical trial. *Science 27 April 1979: 362-363.*
- Larsen JJ, Dera F, Kjaer M y Galbo H. (1997). The effect of moderate exercise on postprandial glucose homeostasis in NIDDM patients. *Diabetologia*, 40 : 447 - 453.
- Lowry O., Rosebrough N. Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 1951 193: 265-275.
- Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Medow MA. (1997). Use of glycosylated hemoglobin levels for diagnosis of diabetes mellitus (letter). *J of American Medicine Association* 277; 211.
- Nathan L. (1989). Test of glycemia in diabetes mellitus. Their use in establishing a diagnosis and in treatment. *Annals of Internal Medicine* 110 : 125 - 137.
- Nelson R. (1988). Oral glucose tolerance test: indications and limitations. *Clinical Proceedings* 63: 263-269.
- Rubin RR, Peyrot M y Saudek CD. (1989). Effect of diabetes education on self-care, metabolic control and emotional well being. *Diabetes Care* 10 : 673 – 67
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México
- Singer D, Coley Ch, Samet J y Nathan D. (1989). Test of glycemia in diabetes mellitus. Their use in establishing a diagnosis and in treatment. *Annals of internal Medicine* 110: 125-137.
- Standley, P. C. y J. A. Steyermark, 1958. Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany* 24 (1).
- Tammy Antonucci, Randall Whitcomb (1997) Impaired Glucose Tolerance is Normalized by Treatment With the Thiazolidinedione Troglitazone *Diabetes Care February 1997*
- Tan GH, Nelson RL. Pharmacologic treatment options for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care Octubre 1997*
- Tchobroutsky G. (1991). Blood glucose levels in diabetic and non diabetic subjects. *Diabetologia* 34: 67-73.
- Trujillo H, Román-Ramos R, Alarcón Aguilar FJ, Carrasco-Sosa S y Contreras-Weber C. (1996). Glucemia máxima en la prueba de tolerancia a la glucosa. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* 17: 13-20.

Vinik AL y Richardson DW. (1 997). Implicationso f the diabetes control and complications trial for persons with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *South-Medicine Journal* 90 : 268 - 282.

White J R . (1 996). The pharmacologic management of patients with type I1 diabetes mellitus in the era of new oral agents and insulin analogs. *Diabetes Spectrum* 9 : 227 - 234.

## Anexos

1. Estudio agudo con dosis de 100, 250 y 500 mg/kg de extracto acuoso. Con una administración vía intraperitoneal.

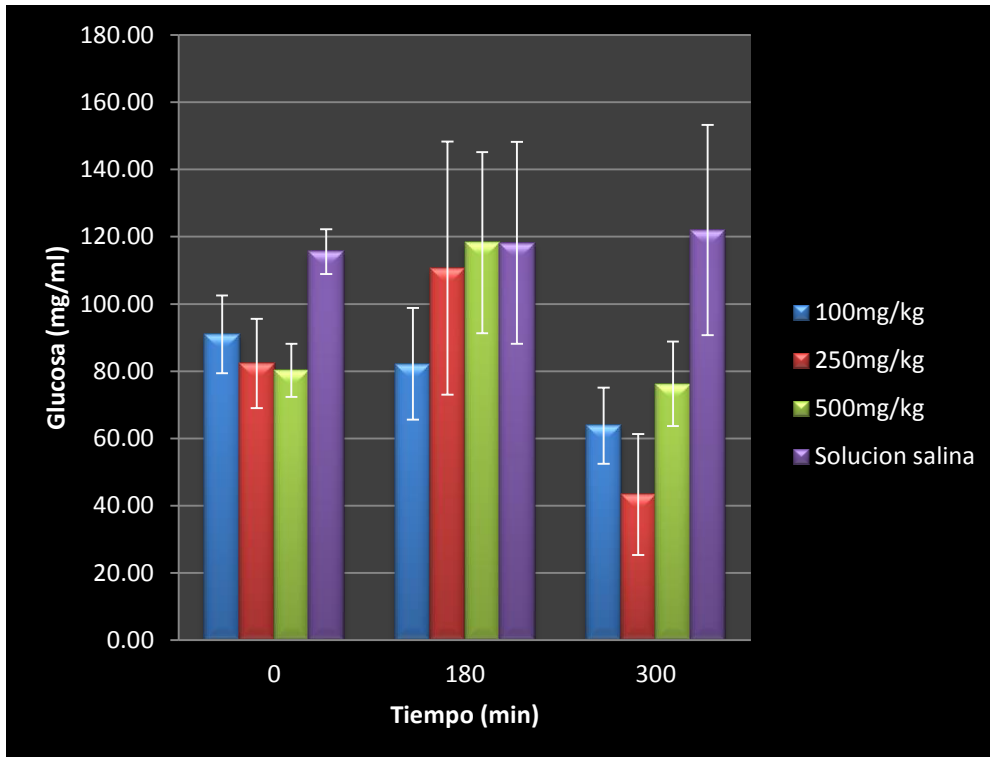
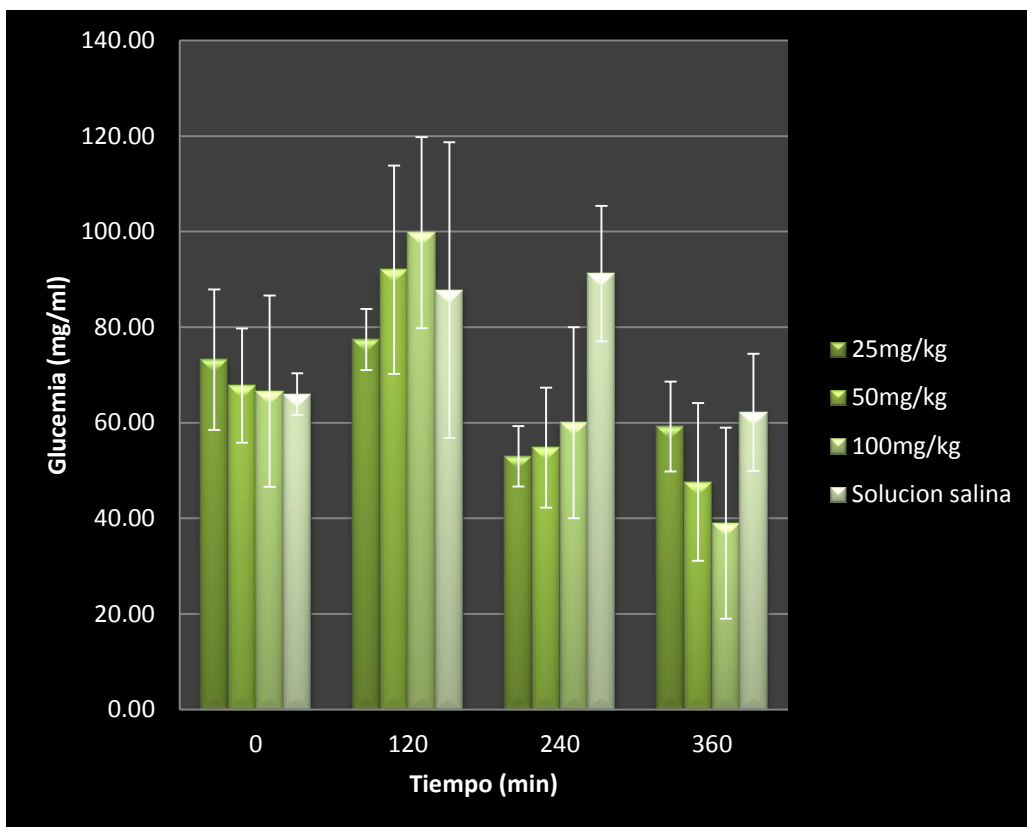


Grafico 6. Glucemias en los tratamientos de 100, 250, 500 mg/kg con barras de desviación estándar.

2. Estudio agudo con dosis de 25, 50 y 100 mg/kg de extracto acuoso. Con una administración vía intraperitoneal.



Grafica 7. Glucemias en los tratamientos de 100, 50, 25 mg/kg con barras de desviación estándar.



### 3. Metodología para realizar Western Blot

Extracción de Proteínas	
<p><b><u>BUFFER DE LISIS</u></b> Para 25 ml.</p> <p>TRIS-HCl 50 mM      0.197 g</p> <p>NaCl 120 mM        0.1753 g</p> <p>IGEPAL 0.5 %        0.125 µl y aforar</p> <p>Ajustar pH 8.0 y agregar</p> <p>NaF 100 mM         0.105 g</p> <p>NaVO<sub>3</sub> 200µM        0.006 g</p> <p>Finalmente por 1 ml de buffer agregar 80 µl de cocktail anti-proteasas (1 pastilla en 2 ml de agua)</p>	
Preparación del Gel	
<p><b><u>Solución Acrilamida-Bis</u></b></p> <p>Acrilamida            14.6 g</p> <p>Bis-acrilamida        0.4 g</p> <p>Agua desionizada    50 ml</p>	<p><b><u>Solución 1.5 M tris-HCl pH 8.8</u></b></p> <p>Tris-base             18.5 g</p> <p>Agua desionizada    100 ml</p> <p>Ajustar a pH 8.8 con HCl    almacenar a 4º C</p>
<p><b><u>SDS al 10 %</u></b></p> <p>SDS                    10 g</p> <p>Agua desionizada    100 ml</p> <p>almacenar a temperatura ambiente</p>	<p><b><u>Solución 0.5 M tris-HCl pH 6.8</u></b></p> <p>Tris-base             6 g</p> <p>Agua desionizadas    100 ml</p> <p>Ajustar a pH 6.8 con HCl    almacenar a 4º C</p>
<p><b><u>Persulfato de Amonio al 10%</u></b></p> <p>Persulfato de amonio 1g</p> <p>Agua dest.            10 ml</p> <p>(preparar sólo lo necesario o guardar por 10 días a 4ºC)</p>	
Preparación de las muestras de proteínas	
<p><b><u>Buffer para muestras 4X</u></b></p>	<p>Tris-HCl pH=6.8 (0.5 M)    0.6 ml del de 1.5 M</p> <p>glicerol                    0.8 ml</p> <p>SDS al 10 %                1.6 ml del de 20%</p> <p>Azul de bromofenol 0.05 % 0.4 ml</p>

	β-mercaptoetanol	0.4 ml
	Agua desionizada	4.2 ml
	Almacenar a T° ambiente. 8 .0 ml	
<b><u>Electroforesis</u></b>		
<b><u>Buffer de corrida</u></b>	<u>1X</u>	<u>10 X</u>
Tris Base	3 g	30 g
Glicina	1.44 g	14.4 g
SDS	<u>1 g</u>	<u>10 g</u>
Agua desionizada	1 L	1 L
<b><u>Transferencia</u></b>		
<b><u>Buffer de transferencia</u></b>	Tris-base	03.03 g
	Glicina	14.4 g
	Metanol	200 ml
	SDS	<u>0.5 g</u>
	Aforar a 1 litro H <sub>2</sub> O    ajustar a pH= 8.3	
<b><u>Metanol absoluto.</u></b>		
<b>Western Blot</b>		
<b><u>TBS</u></b>	<b><u>TBS-Tween 20 0.05%</u></b>	
2.42 g de Tris-HCl (20 mM)	1.0 ml Tween 20 en 1000 ml de TBS.	
8 g de NaCl (137 mM)		
Ajustar el pH a 7.6      Aforar a 1 litro		
<b><u>Albúmina 0.1%</u></b>	<b><u>Leche al 5 %</u></b>	
0.4 g de albúmina en 40 ml de TBS-Tween 20	2 g de leche descremada en 40 ml de TBS-Tween 20	

### Preparación del Gel para WB

- Limpiar cuidadosamente los vidrios para hacer los geles.
- Considerar las cantidades indicadas en la siguiente tabla para la preparación de 2 geles.
- En un vial colocar los reactivos para hacer el gel de corrida, agitar suavemente, tener cuidado al poner el persulfato casi inmediatamente vaciar la solución ya que se inicia la gelificación en algunos minutos, dejar reposar 10-15 min para gelificación completa.
- Posteriormente, preparar en otro vial la solución para el gel concentrador (cuidado al agregar el persulfato, ya que gelificará casi inmediatamente) y colocar el peine, dejar reposar de 10-15 min.

### Elaboración del gel de corrida y gel concentrador .

Reactivos	De Corrida			Concentrador	
	10 %	12 %	15 %		
Agua desionizada ml	4.02	3.34	2.34	Agua desionizada ml	3.05
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 ml	2.5	2.5	2.5	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 ml	1.25
SDS 10 % ml	0.1	0.1	0.1	SDS 10 %	50
Archilamida-Bis ml	3.33	4	5	Archilamida-Bis	650
TEMED	10	10	10	TEMED	10
Persulfato de amonio	50	50	50	Persulfato de amonio	25
Volumen total ml	10	10	10	Volumen total ml	5

- Una vez que está listo el gel, se recomienda hacer una corrida previa a 200 volts. durante 30 min, antes de agregar las muestras de proteínas para correr la electroforesis.

### Preparación de las Proteínas.

- Colocar en cada eppendorf de 200  $\mu$ l (tantos según las muestras que se tengan) 10  $\mu$ l de buffer de muestra. Considerar además la muestra del estándar de proteínas que llevará 10  $\mu$ l.
- Agregar el volumen de la proteína equivalente a 50  $\mu$ g .
- Hervir en B.M. a 95°C por 5 min.
- Hacer lo mismo con 8-10  $\mu$ l del estándar de P.M. con 20  $\mu$ l de buffer de muestra.

5. Cargar la muestra, con jeringa de 50  $\mu$ l, y lavarla con agua caliente en cada toma de muestra.

### **Electroforesis**

1. Una vez hechos los geles, quitar los peines a cada uno, con mucho cuidado para mantener los carriles de los pozos.
2. Colocar los geles en la cámara de electroforesis y llenar con el Buffer de Corrida en el interior y exterior de los geles.
3. Cargar cada una de las muestras en los carriles del gel, para ello utilizando la jeringa Hamilton, cuidar de lavarla cada que se coloque una nueva muestra.
4. Si quedan carriles sin muestra, agregarles sólo buffer de muestra.
5. Correr la electroforesis a 200 volts durante 60 min.

### **Transferencia:**

1. En lo que corre la electroforesis, cortar la membrana de nitrocelulosa a la medida del gel aprox. 8.5 X 5.5 cm, además cortar 4 papeles filtro (Watman No. 3) del mismo tamaño. Hacerlo utilizando guantes.
2. Terminado el tiempo de la electroforesis, despegar el gel de los cristales, cortar el gel de concentración y con mucho cuidado sumergirlo en el buffer de transferencia.
3. Activar la membrana de nitrocelulosa sumergiéndola en metanol absoluto por 30 seg., lavar la membrana con agua desionizada y después colocarla en el buffer de transferencia.
4. Colocar todos los componentes en la unidad de transferencia, de la siguiente manera:

**negro/fibra/2 papel filtro/gel/membrana/2 papel filtro/ fibra/blanco**

Las fibras y el papel filtro se mojan en el buffer de transferencia, antes de acomodarlos.

5. Una vez cerrada la placa de plástico, colocarla en la cámara de transferencia.
6. Llenar la cámara con buffer de transferencia y el depósito blanco con agua, cuidando que no se mezclen.

7. Poner la transferencia a 110 V durante 60 min. a 4° C, para ello se coloca la cámara en una tina con hielo) o toda la noche a 30 volts. dentro del refrigerador y con agitación constante del buffer de transferencia.
8. Una vez terminada la transferencia, sacar la membrana con la cara transferida hacia arriba y bloquearla con 15-20 ml de leche al 5% .
9. Lavar la membrana con solución de TBS-Tween 20 y se puede dejar la membrana en esta solución hasta el día siguiente para continuar.

#### **Bloqueo, lavados y colocación de los anticuerpos:**

1. Terminada la transferencia, sacar la membrana con la cara transferida hacia arriba y bloquearla con 15-20 ml de leche al 5% en TBS-Tween 20, durante 15-60 min. en agitación constante.
2. Pasado este tiempo lavar con TBS-Tween 20 la membrana, 2 ó 3 veces para eliminar el exceso de leche, manejando la membrana con pinzas.
3. Poner el anticuerpo primario policlonal o monoclonal de la proteína que se desea visualizar, generalmente diluída (1:200 o 1:500 o 1:1000) según se indique, en 12 ml de la solución de albúmina en TBS-Tween 20 (para dos membranas), durante 1 h o toda la noche en agitación.
4. Lavar: 2 veces con TBS-Tween 20, por 15 min.
5. Poner 3 µl del anticuerpo secundario, en 30 ml de la solución de albúmina en TBS-Tween 20 por 1 h.
6. Lavar 2 veces 10 min con TBS-Tween 20 y 1 vez por 5 min con TBS-solo.
7. Poner a la membrana 2 ml de sustrato luminiscente (Kit SuperSignal® West Pico Substrate).

#### **Revelado**

- 1 Realizarlo en cuarto oscuro. Colocar la membrana en la placa reveladora cubierta con plástico y exponerla a una película Kodak por 30 seg.
- 2 Revelar y fijar la película, Dependiendo de la intensidad de las bandas, exponer más o menos tiempo.
- 3 Cuantificar por análisis densitométrico.

Nota: Para normalizar la cantidad de proteína de las bandas, se “estripea” la membrana (se lava de las proteínas adheridas) y se repiten los puntos del 3 al 7 del paso VIII, pero utilizando como anticuerpo primario a la Actina y como anticuerpo secundario

**Solución de estripeado**

Tris-Base 50 mM pH=2.0 6.057 g en 1 L de agua desionizada.

**“Estripeado”.**

Lavar la membrana con Tris-Base pH= 2.0, por 2 h, cambiando la solución cada 30 min.

Nota: considerar siempre en que está hecho el anticuerpo primario para usar correctamente el anticuerpo secundario.jos

Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario
policlonal de conejo, Sta. Cruz.	Goat anti-rabbit, Sta. Cruz
Actina goat polyclonal	Mouse anti-goat