



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA/UIEM**

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Regulación del nivel de ARNm de enzimas antioxidantes y
Neuropéptido Y por extracto de ajo envejecido en
hipotálamo de ratas diabéticas.”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:
MARTHA ISELA BARRAGÁN BONILLA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MÓNICA ESPINOZA ROJO
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ**

CHILPANCINGO, GRO., NOVIEMBRE DEL 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio de dos mil quince, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Regulación del nivel de ARNm de enzimas antioxidantes y Neuropeptido Y por extracto de ajo envejecido en hipotálamo de ratas diabéticas”, presentada por la alumna Martha Isela Barragán Bonilla, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

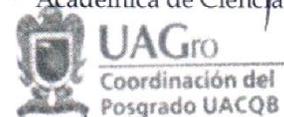
Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dra. Penélope Aguilera Hernández

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado de la Unidad
Académica de Ciencias Químico Biológicas



Dra. Amalia Vences Velázquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero; en colaboración con el Laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) “Manuel Velasco Suárez” de la S.S.A. en México, D.F.

Bajo la dirección de la
Dra. Mónica Espinoza Rojo

La Codirección de la
Dra. Penélope Aguilera Hernández

La asesoría de
Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Durante el periodo en que la C. Martha Isela Barragán Bonilla cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca de CONACyT con número de becario: 364839.

Además, recibió el apoyo del Área de Cooperación e Intercambio Académico de la UAGro al otorgarle una beca parcial de Movilidad Nacional durante el periodo de Enero-Junio del 2015.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la dicha de realizar y concluir esta etapa al lado de personas extraordinarias: Durante estos dos años, me he rodeado de mucha gente joven (y no precisamente hablo de la edad) que aún aprecia los buenos momentos, que valoran los detalles pequeños y los convierten en grandes recuerdos. Cada persona ha dejado una marca indeleble. Y les agradezco a todos ellos por estar presentes, por apoyarme y creer en mí.

A mi familia, de quienes he recibido mucha admiración, sin embargo, a ellos les debo mi presente, siempre me han brindado el cariño y apoyo que he necesitado a lo largo de toda mi vida, y son personas a quienes respeto y admiro, y son un motivo más para continuar.

A mis amigos, a los que ya estaban y esperaron pacientemente para encontrarnos; a quienes conocí en estos dos años: gracias por tolerar mis enojos y mis graciosadas a veces sin sentido (hablo de las personas con quienes compartí la clase de seminario: César, Toño, Judit, Barrera, Ocampo; y Monse).

A Gerardo, quien se ha convertido en ese alguien que le da fuerza a esta persona que escribe, para no rendirse, para no “tirar la toalla”, en momentos difíciles, y quien me tiende una mano o las dos para levantarme, cuando se me han acabado las fuerzas y las ganas.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo, quien después de algunos años de compartir el trabajo, se ha convertido en una persona importante para mí. Le agradezco la confianza puesta en mí, su apoyo incondicional en la parte académica y en mi formación personal, sus consejos y sugerencias en todos los aspectos. En realidad, las palabras no alcanzan para escribir sobre mi gratitud para con ella.

A las personas con las que compartí el trabajo en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica: Gabriel, Lizbeth, Víctor, Lupita, Pedro, Brenda, Migue, Emmanuel, Nayely, David, Raúl. Que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme en cualquier momento, y de todas las formas posibles, únicos e irrepetibles.

A todas las personas que aportaron un poco o mucho de su tiempo y conocimientos para contribuir al enriquecimiento de este trabajo, que sin duda, su colaboración ha sido singular para formarme en lo académico y en lo personal, de ellos he aprendido más de lo que se supone que me enseñarían:

A mis sinodales: Dra. Penélope Aguilera, Dr. Eduardo Castañeda, Dr. Eneas A. Chavelas, Dr. Daniel Hernández por sus comentarios y sugerencias valiosas en la elaboración de este proyecto.

Al Dr. Miguel Mendoza del Laboratorio de Biomedicina por su apoyo incondicional al facilitarnos el uso de los equipos de vital importancia para desarrollar mi trabajo de investigación.

Dra. Yanet Castro del Laboratorio de Citopatología, Dra. Meche del Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, M. C. Marco Antonio del Laboratorio de Toxicología.

A quienes me brindaron su ayuda para el desarrollo de este trabajo, y a quienes me ofrecieron su amistad durante los periodos de estancia:

En el Laboratorio de Patología Vascul ar Cerebral del INNN Manuel Velasco Suárez:

Dra. Penélope, Dr. Moisés y Dra. Sonia quienes me capacitaron con diferentes técnicas o modos para extraer el hipotálamo

Nara, Iván, Carlos, Karen y Pepe.

En el Laboratorio de Inmunoquímica, del Hospital de especialidades, CMN Siglo XXI

Dr. Armando Isibasi, Dra. Lourdes Arriaga y a sus alumnos:

MC Esteban Domínguez, MC Luis Ángel, MC Alexis, Jessica, Libier, Gregorio

Gracias.

DEDICATORIA

*A todos los animales que son usados para fines de investigación,
aunque sé que ellos no sabrán de esta dedicatoria,
es necesario hacerles su debido reconocimiento.*

**“Regulación del nivel del ARNm de enzimas antioxidantes y
Neuropéptido Y por extracto de ajo envejecido en hipotálamo de
ratas diabéticas.”**

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	ABSTRACT	2
III.	INTRODUCCIÓN	3
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	6
V.	RESULTADOS	9
VI.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	17
VII.	AGRADECIMIENTOS	24
VIII.	ANEXOS	25
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

I. RESUMEN.

El hipotálamo es una región cerebral que regula la conducta alimenticia, y estudios recientes han mostrado que tiene un papel en la homeostasis de la glucosa. El Neuropeptido Y (NPY) es un péptido hipotalámico, importante para la promoción del apetito, mientras que las especies reactivas de oxígeno (EROs) producidas en esta zona son clave para la regulación de la saciedad. Se ha descrito que en la diabetes mellitus (DM) hay hiperfagia, la cual está relacionada con niveles incrementados del mensajero del NPY; de igual manera, hay estrés oxidativo en cerebro (niveles elevados de EROs y reducción de mecanismos de defensa antioxidante). Por ello, se sugiere que la hiperfagia en la DM podría ser producto del estrés oxidativo en hipotálamo. El extracto de ajo envejecido (EAE) es un poderoso antioxidante que ha mostrado revertir varias alteraciones de la DM asociadas con el estrés oxidativo. El objetivo de este estudio fue determinar si el EAE tiene efecto sobre la expresión de genes como NPY y de enzimas antioxidantes [superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx)] en hipotálamo de ratas diabéticas en relación con su concentración de glucosa y nivel de EROs. Se usaron ratas Wistar (280-350g); la DM fue inducida por tratamiento con estreptozotocina (60mg/kg) administrada intraperitonealmente (i.p.). El EAE [100 y 200 mg vía i.p.; 200 y 300 mg vía oral] fue administrado diariamente durante 4 semanas. La expresión de los ARNm de NPY, SOD, CAT y GPx fue medida por RT-PCR en tiempo real y el nivel de EROs por citometría de flujo. Las ratas diabéticas mostraron incremento de glucosa sanguínea y aumento en la expresión del NPY, SOD2, CAT y GPx en comparación con el grupo control ($p < 0.05$) mientras que no se observaron cambios en el nivel de EROs ($p > 0.05$). Sólo la administración de 200 mg de EAE vía i.p. tuvo efecto anti-hiperglucemiante, e indujo incremento en la expresión del NPY y enzimas antioxidantes en ratas diabéticas y control ($p < 0.05$), además disminuyó el nivel de EROs únicamente en ratas control ($p < 0.05$), puesto que no se observaron cambios en las ratas diabéticas ($p > 0.05$). Estos hallazgos sugieren que el EAE (200mg i.p.) tiene el potencial de estimular la expresión de las enzimas antioxidantes y del NPY en el hipotálamo.

Palabras clave: neuropeptido Y, enzimas antioxidantes, diabetes, extracto de ajo envejecido, especies reactivas de oxígeno.

II. ABSTRACT.

The hypothalamus is a brain region that regulates feeding behavior, recent studies have shown that it has a role in glucose homeostasis. Neuropeptide Y (NPY) is a hypothalamic peptide important for appetite promotion, while the reactive oxygen species (ROS) produced in this region are important for regulation of satiety. In diabetes mellitus (DM), the hyperphagia has been related with increased NPY levels; additionally, there is oxidative stress in brain (increased ROS levels and reduction of antioxidant defense mechanisms). It is probably that hyperphagia in DM could be a product of oxidative stress in hypothalamus. The aged garlic extract (AGE) is a powerful antioxidant that has been shown to reverse several alterations associated with oxidative stress in the DM. The aim of this study was to determinate if the AGE has an effect on NPY and antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD1 and SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX)] mRNA levels in hypothalamus of diabetic rats in relation with their blood glucose and ROS level. Male Wistar rats (280-350g) were used. DM was induced by treatment with streptozotocin (60mg/kg bw) administered intraperitoneally (i.p.). AGE (100 and 200 mg i.p.; 200 and 300 mg orally) was administered daily for 4 weeks. The NPY, SOD, CAT and GPx mRNA levels were measured by real-time RT-PCR, and levels of ROS by flow citometry. Diabetic rats showed increase of blood glucose, NPY, SOD2, CAT and GPx mRNA levels compared with control group ($p < 0.05$), while no changes were observed in ROS levels ($p > 0.05$). Only I.p. administration of 200 mg AGE has anti-hyperglycemic effect, and increased of NPY and antioxidant enzymes gene expression in diabetic and control rats ($p < 0.05$). Moreover, it caused a decrease in the level of ROS only in control rats ($p > 0.05$). These findings suggest that AGE (200mg i.p.) stimulates the expression of antioxidant enzymes and NPY in hypothalamus.

Key words: neuropeptide y, antioxidant enzymes, diabetes, age aged garlic extract, reactive oxygen species.

III. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico crónico que representa un grave problema de salud pública, se caracteriza por concentraciones elevadas de glucosa en circulación (hiperglucemia) y estrés oxidativo, además de alteraciones en moléculas que regulan la ingesta de alimentos, lo que conlleva trastornos en la conducta alimenticia (hiperfagia) (American Diabetes Association, 2014; Beagley *et al.*, 2013; Federación Internacional de Diabetes, 2013; Gehlert, 2004; Matough *et al.*, 2012). La conducta alimenticia es regulada en la región cerebral hipotalámica, la cual, también tiene un papel clave en la homeostasis de la glucosa. Esta área integra diversas señales centrales de neuropéptidos, señales periféricas hormonales, y de nutrientes que le indican el estado energético en el que se encuentra el organismo. Una de las moléculas más importantes que regulan la ingesta de comida es el neuropéptido Y (NPY), un péptido que induce rápidamente el apetito (orexigénico) y se encuentra abundantemente en esta región (Gehlert, 2004, Williams *et al.*, 2001). Su expresión es estimulada en condiciones de déficit de energía (como el ayuno) por grelina, para favorecer el consumo de comida y restaurar el balance energético; y es inhibida por leptina e insulina después de ingerir alimentos favoreciendo la saciedad. Sin embargo, en la DM existe una respuesta inadecuada de estas hormonas, lo que genera alteraciones en el nivel de expresión del NPY en el hipotálamo (Arora y Anubhuti, 2006; Williams *et al.*, 2001). En estudios con modelos experimentales de DM inducida con estreptozotocina (STZ), se ha evidenciado que el nivel de expresión del ARNm del NPY en hipotálamo está incrementado (Mao *et al.*, 2002; Sahu *et al.*, 1997), y en pacientes con DM se han encontrado niveles elevados de NPY en plasma; ambos hallazgos han sido relacionados con hiperfagia y polidipsia (Ilhan *et al.*, 2010; Matyal *et al.*, 2011; Milewikz *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 1999).

La hiperglucemia en el estado diabético provoca estrés oxidativo, es decir, se genera una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que en condiciones fisiológicas, son rápidamente neutralizadas por el sistema de defensa antioxidante endógeno conformado por enzimas como manganeso-superóxido dismutasa (MnSOD o SOD2), Zn-CuSOD (SOD1), glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa

(CAT) (Gutowski y Kowalczyk, 2013; Nelson, 2005), sin embargo, en la DM, la sobreproducción de EROs favorece a la disminución en la capacidad del sistema de defensa antioxidante (Muriach *et al.*, 2014)

Las EROs se han asociado con la activación de algunas vías de señalización sensibles al estrés (e. g. p38 MAPK, JNK) que regulan varios factores de transcripción como NF- κ B, AP-1, HIF, Nrf2, Sp1, NF1, y la expresión subsecuente de genes que en sus promotores contengan sitios de unión para estos factores de transcripción. Dado que el promotor del NPY tiene sitios de unión potenciales para los factores de transcripción AP-1, AP-2, Sp1 (Andersson *et al.*, 1994; Minth y Dixon, 1990), se sugiere que su expresión puede estar modulada por EROs. Algunos estudios de tipo experimental han demostrado que la producción elevada y aguda de EROs en el hipotálamo está asociada a una disminución del apetito en individuos sanos, acompañado de una baja expresión del NPY (Diano, 2013; Hsieh *et al.*, 2006). Sin embargo, en un estado de hiperglucemia crónica como en la DM, en donde existe una sobreproducción crónica de EROs, el sistema regulador del apetito se altera, induciendo hiperfagia (Drougard *et al.*, 2015). No obstante, se considera que los efectos de las EROs pueden variar dependiendo de sus niveles de producción, ya sea baja, moderada o elevada, aguda o crónica (Johnson *et al.*, 2008; Königsberg, 2007; Luna, 2007; Pandya *et al.*, 2011).

Por otra parte estudios con antioxidantes como el resveratrol y la curcumina han demostrado que estos compuestos pueden inducir una disminución del estrés oxidativo y atenuar las alteraciones a nivel neurológico de animales diabéticos (Jing *et al.*, 2013; Kuhad y Chopra, 2007). Aunado a esto, numerosos estudios *in vivo* han demostrado que el extracto de ajo envejecido (EAE) es un poderoso antioxidante que disminuye el estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas con STZ, mejora la hiperglicemia, atenúa síntomas derivados de la DM y previene algunas complicaciones (Anwar y Meki, 2003; Barragán y Rodríguez, 2013; Drobiova *et al.*, 2011; Mendoza y Mora, 2012; Thomson *et al.*, 2006, 2007).

Debido a que la capacidad de estos compuestos para atrapar EROs puede regular la expresión de algunos genes afectados por EROs, se sugiere que el EAE puede tener el potencial de modular el nivel del ARNm del NPY, pero además la expresión de las enzimas antioxidantes, puesto que los promotores de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT y GPx también tienen sitios de unión para factores de transcripción sensibles a EROs como NF1, NF- κ B, AP-1, Nrf2 (Evans, 2002; Königsberg, 2008; Luna, 2007). De esta manera, además de que un antioxidante como el EAE podría controlar los niveles de EROs, estaría mejorando la capacidad del sistema de defensa antioxidante endógeno, previniendo las alteraciones en la DM provocadas por estrés oxidativo.

En el presente estudio, examinamos el efecto del EAE sobre el nivel de EROs, y en la expresión de enzimas antioxidantes y del NPY en hipotálamo de ratas diabéticas. Nuestros resultados indicaron que el EAE no modifica el nivel de EROs, sin embargo, sí induce un incremento en la expresión de los mensajeros de las enzimas antioxidantes SOD2, GPx y CAT, además de la del NPY. Los cambios observados podrían asociarse a una mejoría de las ratas diabéticas.

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio:

El presente estudio es de tipo experimental, se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en colaboración con el Laboratorio de Patología Vascular Cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) “Manuel Velasco Suárez” de la S.S.A.

Material y métodos:

Animales. Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar con un peso de 280 a 350 g. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio, mantenidas sobre ciclos de 12h luz/12h oscuridad; y tuvieron acceso libre a agua y comida (Dieta comercial estándar de Harlan No. 2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) durante el experimento. Las ratas fueron cuidadas y tratadas bajo las condiciones que dicta la NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y las normas establecidas por la comisión de ética del INNN.

Inducción de diabetes. Se administró por vía intraperitoneal (i.p.) una sola dosis (60 mg/kg) de STZ (de Sigma Aldrich; No. S0130) disuelta en 100 µl de buffer de citrato de sodio pH de 4.5, 0.1 M (Mora H. *et al.*, 2009). La DM fue confirmada 48 h después de la inyección de STZ. Las ratas fueron mantenidas sin tratamiento hasta 7 días antes de aplicar el EAE [adquirido de Wakunaga de América Co., Ltd (Mission Viejo, Ca, USA)]. Las muestras sanguíneas se obtuvieron mediante una incisión en la cola de las ratas. Las concentraciones de glucosa fueron determinadas con el kit de diagnóstico OneTouch® Ultra™, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las ratas que tuvieron una concentración de glucosa sanguínea igual o superior a 250 mg/dl fueron seleccionadas y usadas en este estudio.

Programa de tratamiento. Las ratas fueron clasificadas aleatoriamente en 10 grupos de 4-5 animales cada uno: 1) Animales control no diabéticos (**Control**); 2 y 3) Animales control no diabéticos, tratados con 100 ó 200 mg de EAE por kg de peso corporal (PC) administrado vía i.p. (**C100 IP** y **C200 IP**); 4 y 5) Animales control no diabéticos tratados con 200 ó 300 mg de EAE/kg PC administrado vía oral (**C200 OR** y **C300 OR**); 6) Animales control diabéticos sin tratamiento (**Diabéticas**); 7 y 8) Animales diabéticos con 100 ó 200 mg de EAE/kg PC administrado vía i.p. (**D100 IP** y **D200 IP**); 9 y 10) Animales diabéticos con 200 ó 300 mg de EAE/kg PC administrado vía oral (**D200 OR** y **D300 OR**). El EAE fue administrado diariamente durante 28 días consecutivos (de 8:00 am a 9:00 am). El PC y las concentraciones de glucosa sanguínea fueron medidos al inicio del experimento para tener un valor de referencia, después de inducir DM y al finalizar el experimento para observar el efecto de los 28 días de tratamiento con EAE sobre estos parámetros.

Sacrificio. Al finalizar el tratamiento con el antioxidante, los animales fueron anestesiados con 300 µl (19 mg) de pentobarbital sódico (de Cheminova) y sacrificados por decapitación cervical, inmediatamente se extrajo el cerebro y se diseccionó para obtener el hipotálamo. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Detección de EROs por citometría de flujo. Se realizó disgregación del hipotálamo con aproximadamente 10 mg de tejido en 1 ml de PBS 0.1 M pH 7.4 en frío. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con 2.5 µM de reactivo CellROX® Green (Life Technologies™ USA No. C10444), durante 30 min a 37°C, la cual es una sonda fluorescente que se une a las EROs, oxidándose y subsecuentemente se une al ADN. Transcurrido el tiempo se sometieron a dos lavados con PBS 0.1 M pH 7.4 a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras fueron leídas en un citómetro de flujo FACS CANTO DIVA usando detectores FITC (485-520 nm) y la intensidad de fluorescencia fue proporcional a la cantidad de EROs presentes en el tejido. Se incluyó un control positivo con H₂O₂ (ver Anexo 2).

Extracción de ARN total y RT-PCR en tiempo real. Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido de hipotálamo. Se extrajo el ARN total con Trizol (de Invitrogen USA No. 15596018; Chomczynski, 1993), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total usando hexámeros al azar (de Applied Biosystems USA No. 28025-013) como iniciadores. El análisis de expresión de los ARNm de *npy* (Rn01410145_m1), *sod1* (Rn00566938_m1), *sod2* (Rn0069058_g1), *cat* (Rn00560930_m1), y *gpx* (Rn00577994_g1) se realizó empleando ensayos prediseñados por Applied Biosystems; y como control interno para normalizar los datos se utilizó el ARNr de la subunidad 18S (Applied Biosystems USA No. 4308329). Antes de realizar la amplificación se hicieron *curvas de validación* para determinar la eficiencia de amplificación para cada gen. Para esto, se hicieron diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 del cDNA de ratas del grupo control. Se realizó PCR en tiempo real y se obtuvieron los valores de CT de los amplificadores; se calcularon las ΔCT y mediante la fórmula de la recta ($y=mx+b$) se obtuvo la pendiente. La máxima eficiencia se logra cuando el resultado de la pendiente (m) es menor o igual a 0.1. Con los resultados obtenidos se validó el uso de las sondas.

La reacción de amplificación fue realizada a partir de 1 µl de la dilución 1:4 de ADNc, a la cual se le adicionó 5 µl de Máster Mix (Applied Biosystems USA No. 4440038), 0.5 µl de sonda TaqMan, y se aforó a un volumen final de 10 µl con H₂O destilada. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el proveedor (1 ciclo de 2 min a 50°C, 1 ciclo de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C, y 1 ciclo de 10 seg a 20°C), usando un termociclador PikoReal v2.2. Todas las reacciones de PCR se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo sin ADNc. El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Análisis estadístico. Los datos son expresados como media \pm EE. La variación entre grupos fue medida por un análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey. El análisis estadístico fue realizado usando el Software Graphad Prism v5.0. La significancia estadística fue considerada con un valor de $p < 0.05$

V. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el efecto de 28 días tratamiento con EAE, administrado por vía i.p. y oral, y en dosis diferentes: 100, 200 y 300 mg. Considerando que la inyección i.p es una vía directa de administración de fármacos, se emplearon las dosis 100 y 200 mg; en tanto que la vía oral es comúnmente usada, sin embargo, su efecto depende de procesos como absorción durante su paso por el aparato gastrointestinal y sabiendo que pueden perderse algunos componentes durante ese proceso, se emplearon 200 y 300 mg como dosis (Flórez *et al.*, 1998).

1. Efecto del EAE en la concentración de glucosa sanguínea

La administración de STZ para inducir DM, produjo un aumento significativo de hasta 4 veces en los niveles de glucosa sanguínea (datos no mostrados en esta sección; ver Anexo 1). En la figura 1 se muestra el cambio en el nivel de glucosa entre los valores obtenidos después de inducir DM y después de haber finalizado los 28 días tratamiento con EAE. Observamos que el grupo de ratas diabéticas mostró un incremento significativo de glucosa del 26.5 % con respecto a su valor inicial en la inducción de DM ($p < 0.05$; Figura 1, "Diabéticas"). El tratamiento con 100 mg de EAE/kg de PC a ratas diabéticas por vía i.p. atenuó ese incremento sólo en un 4 % ($p > 0.05$; Figura 1, "D100 IP"), mientras que la administración de 200 mg de EAE vía i.p. ($p < 0.05$) y oral ($p > 0.05$) evitó que se aumentaran las concentraciones de glucosa, manteniéndolas sin cambios al finalizar el tratamiento (Figura 1, "D200 IP" y "D200 OR"). En contraste a la dosis de 200 mg, observamos que la administración de 300 mg de EAE por vía oral no modificó el nivel de glucosa sanguínea ($p > 0.05$; Figura 1, "D300 OR").

Por otra parte, a los animales control a los que se les administró el EAE no mostraron ningún cambio en la concentración de glucosa con respecto a los controles sin tratamiento a lo largo del experimento ($p > 0.05$). Lo anterior se observó para todas las dosis de forma independiente de la vía de administración (Figura 1, grupos "C100 IP", "C200 IP", "C200 OR" y "C300 OR" vs "Control").

Estos resultados indican que el tratamiento con EAE en las condiciones evaluadas, muestra un efecto anti-hiperglucemiante en dosis de 200 mg/kg de PC por ambas vías de administración.

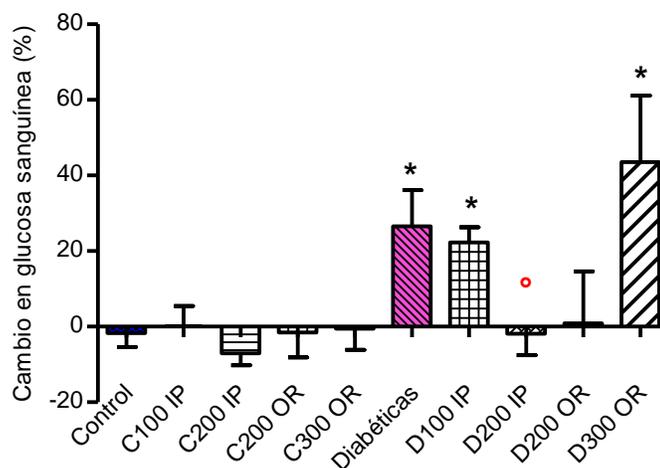


Figura 1. Efecto del EAE sobre el nivel de glucosa sanguínea en ratas sanas y diabéticas. Se muestran el cambio en los niveles de glucosa sanguínea en % (media±EE) en grupos control y experimentales (diabéticas inducidas con 60 mg de STZ por kg de PC) después de 28 días de tratamiento con diferentes dosis de EAE administrado por vía oral (OR) e intraperitoneal (IP). C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100 mg de EAE/kg PC por IP; C200 IP, C200 OR, D200 IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC, vía IP u OR; C300 OR y D300 OR = 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control; °Diferente de Diabéticas).

2. Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el peso corporal

Los modelos experimentales de DM suelen caracterizarse por una pérdida severa de PC. Reportes previos indican que la administración de antioxidantes puede revertir o prevenir esta consecuencia en la DM (Thomson *et al.*, 2007). Es por eso que en nuestro estudio, con el objetivo de evaluar el efecto del EAE sobre cambios en el PC de ratas diabéticas, se determinaron las diferencias de este parámetro entre el inicio de la DM hasta terminar el tratamiento con EAE.

En la figura 2, observamos que las ratas diabéticas disminuyeron significativamente su PC ($p < 0.05$). El tratamiento con EAE en cualquiera de las dosis o vías administradas, no previno la pérdida de PC que ocurre durante la DM. De igual manera, las ratas control no mostraron cambios importantes en su PC con el antioxidante.

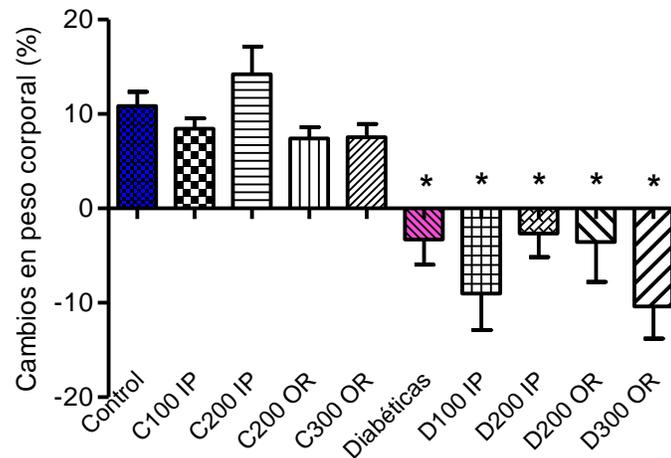


Figura 2. Efecto del EAE sobre el peso corporal. Se grafican los cambios en el PC (%) (media \pm EE) en grupos control y experimentales (DM inducida con STZ), entre el valor del PC obtenido después de haber inducido DM y entre el obtenido después de 28 días de tratamiento con EAE. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100mg de EAE/kg PC por vía intraperitoneal (IP); C200 IP, C200 OR, D200IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC i.p. u oral (OR); C300 OR y D300 OR= 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control).

3. Efecto del EAE en la regulación del estrés oxidativo.

3.1 Efecto del EAE sobre el nivel de EROs

Con el propósito de determinar si el EAE es capaz de disminuir el estrés oxidativo, se midió el nivel de EROs en hipotálamo de ratas diabéticas y no diabéticas por citometría de flujo.

En la figura 3, observamos que el grupo de ratas “Diabéticas” no mostró cambios en el nivel de EROs en el hipotálamo al compararlas con el grupo “Control” ($p > 0.05$). De igual manera, la administración de EAE no tuvo efecto sobre el nivel de EROs en ratas diabéticas. Sin embargo, en los grupos de ratas control, la administración de 200 mg/kg vía i.p. del antioxidante, indujo una disminución (29.2 %; $p < 0.05$) en el nivel de EROs; y se observó la misma tendencia cuando se les administró 200 mg (16 %; $p < 0.05$) y 300 mg (13.2 %; $p < 0.05$) por vía oral.

Los resultados obtenidos reflejan la capacidad antioxidante del EAE sólo en ratas no diabéticas.

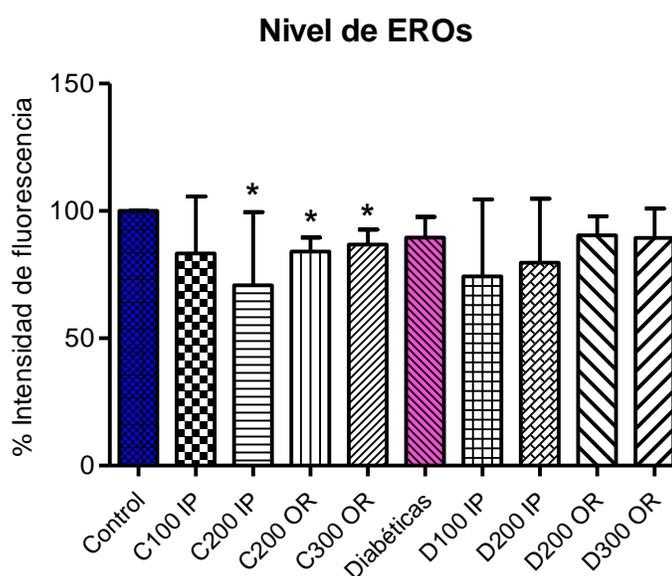


Figura 3. Efecto del EAE sobre el nivel de EROs en hipotálamo. Se observan la intensidad de fluorescencia en porcentaje (%) del nivel de EROs presentes a los 28 días de tratamiento con EAE. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100mg de EAE/kg PC por vía intraperitoneal (IP); C200 IP, C200 OR, D200IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC i.p. u oral (OR); C300 OR y D300 OR= 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control).

3.2 Efecto del EAE en el nivel de expresión de los ARNm de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT y GPx.

Para evaluar los cambios que ocurren en el sistema de defensa antioxidante de ratas diabéticas y determinar el efecto del tratamiento con EAE, evaluamos la expresión de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT y GPx por PCR en tiempo real (Figura 4)

En nuestro modelo de estudio, las ratas diabéticas mostraron aumento en la expresión de los ARNm de las enzimas antioxidantes SOD2 (0.9 veces), CAT (1 vez) y GPx (0.6 veces) con respecto a las ratas control ($p < 0.05$), sin cambios significativos en el nivel del mensajero de SOD1 ($p > 0.05$).

El tratamiento con 200 mg de EAE vía i.p. a ratas diabéticas, produjo incremento en la expresión de SOD2 (3.6 veces), CAT (7.2 veces) y GPx (4.5 veces) de forma significativa con respecto al grupo diabético no tratado ($p < 0.05$). Mientras que no se observaron cambios importantes en ninguna otra de las condiciones.

En ratas sanas, la administración i.p. de 100 mg ó 200 mg de EAE provocó un incremento significativo en la expresión del ARNm de todas las enzimas antioxidantes: SOD1 (0.7 y 1.6 veces), SOD2 (0.9 y 4.7 veces), CAT (2.5 y 7.4 veces) y GPx (2.3 y 5.3 veces) respectivamente ($p < 0.05$).

Sin embargo, la administración oral de 200 mg de EAE, no genera cambios en el nivel de expresión de las enzimas evaluadas ($p > 0.05$); mientras que la dosis de 300 mg de EAE por vía oral, incrementó los mensajeros de SOD2 (1 vez), CAT (1.9) y GPx (2.7) ($p < 0.05$).

Estos datos nos muestran que en ratas diabéticas, la dosis de 200 mg de EAE vía i.p. es capaz de incrementar el sistema de defensa antioxidante a nivel de ARNm; mientras que, en animales control, fueron las de 100 y 200 mg de EAE por vía i.p. y 300 mg por vía oral.

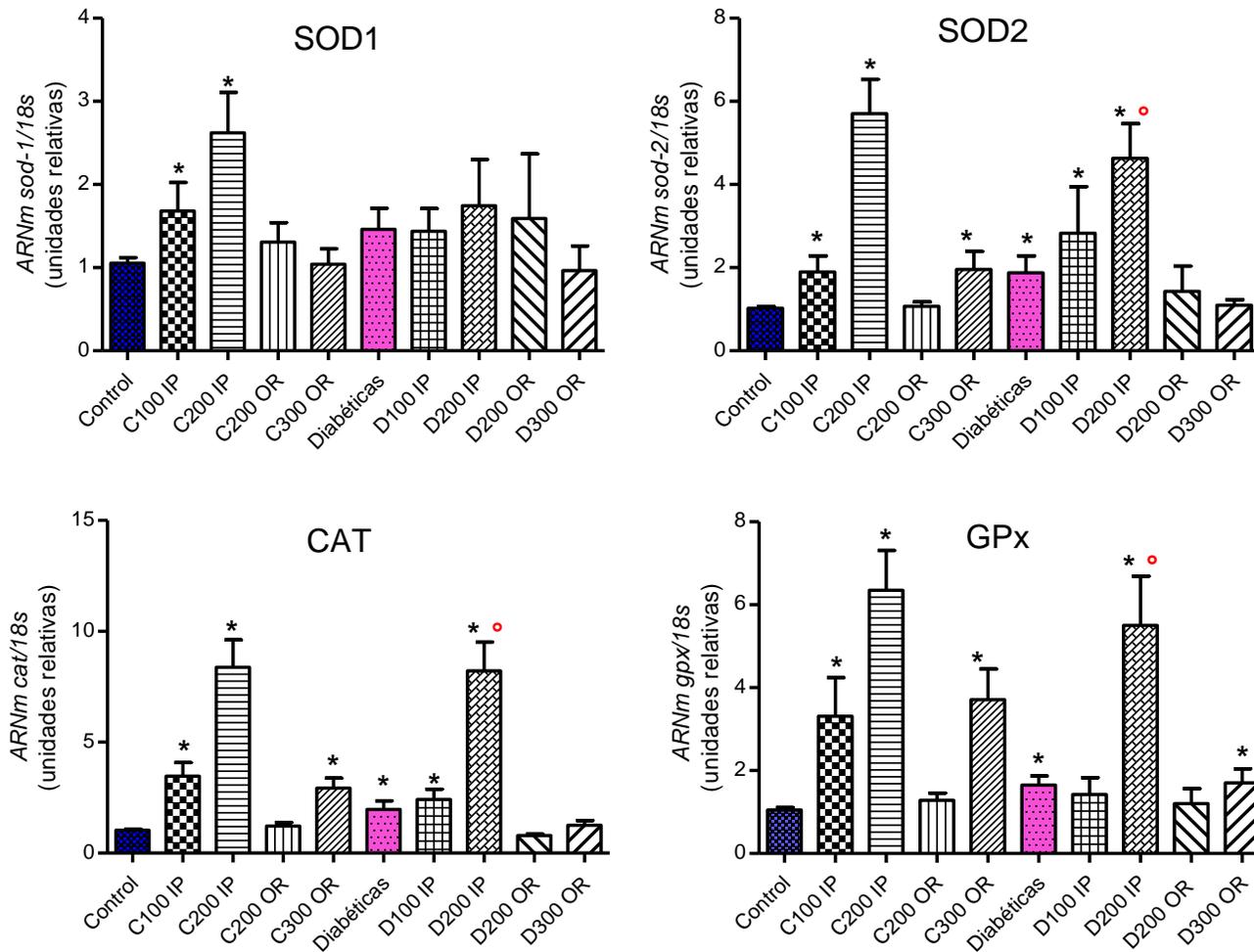


Figura 4. El tratamiento con 200 mg de EAE vía i.p. induce la expresión de los ARNm de enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, CAT, GPx) en hipotálamo de ratas control y diabéticas. Se observan las mediciones del nivel de expresión de los mensajeros de las enzimas antioxidantes a los de 28 días de tratamiento con EAE. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100mg de EAE/kg PC por vía intraperitoneal (IP); C200 IP, C200 OR, D200IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC i.p. u oral (OR); C300 OR y D300 OR= 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control; [◦] Diferente de Diabéticas).

4. Efecto del EAE sobre la expresión del NPY en hipotálamo.

Con el fin de determinar si el EAE puede regular la expresión del NPY hipotalámico en ratas diabéticas después de 28 días de tratamiento con EAE, se midió el nivel de expresión del mensajero de este neuropéptido por PCR en tiempo real.

En figura 5, se puede observar que el nivel de expresión del ARNm del NPY aumenta hasta 4.8 veces en ratas diabéticas comparadas con el grupo de ratas control ($p < 0.05$). El tratamiento con EAE induce un mayor aumento en su expresión: a) 100 mg de EAE vía i.p. provocó aumento de 8.4 veces ($p > 0.05$); b) 200 mg de EAE vía i.p. genera incremento de 11.6 veces ($p < 0.05$); c) 200 mg de EAE vía oral induce el aumento de 9.6 veces ($p > 0.05$) y, d) 300 mg de EAE vía oral provoca un incremento de 9.2 veces ($p > 0.05$).

Asimismo, la administración del antioxidante en ratas sanas también induce cambios en la expresión del NPY con respecto al grupo de ratas control no tratadas: a) 100 mg i.p. indujo aumento en la expresión del NPY hasta 4.4 veces ($p < 0.05$); b) 200 mg i.p. provocó aumento de 5 veces más ($p < 0.05$); c) 200 y 300 mg de EAE vía oral incrementó al NPY en 2 y 2.8 veces más, respectivamente ($p < 0.05$).

Los datos aquí mostrados nos sugieren que el EAE regula positivamente la expresión del NPY en hipotálamo de ratas sanas y diabéticas.

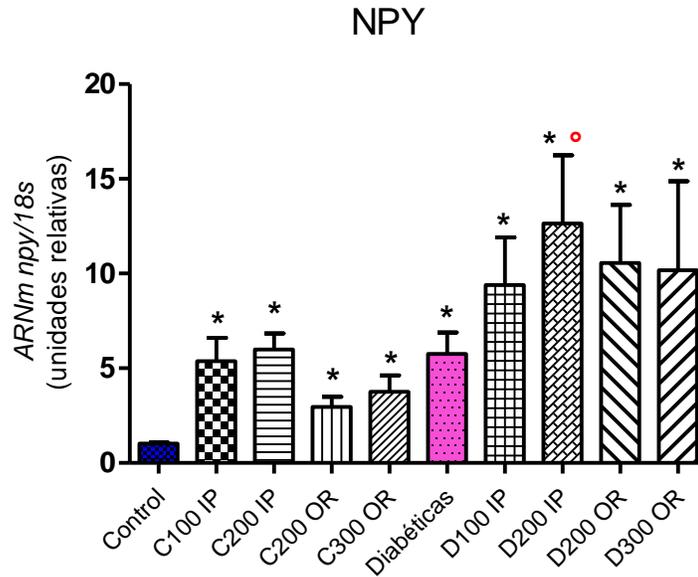


Figura 5. El tratamiento con EAE incrementa la expresión del ARNm del NPY en ratas control y diabéticas. Se observan las mediciones del nivel de expresión del mensajero del NPY a los de 28 días de tratamiento con EAE. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100mg de EAE/kg PC por vía intraperitoneal (IP); C200 IP, C200 OR, D200IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC i.p. u oral (OR), C300 OR y D300 OR= 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control; \circ Diferente de Diabéticas)

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El nivel del ARNm del NPY se incrementa en ratas diabéticas.

En el presente estudio, el aumento en la expresión del ARNm del NPY encontrado en hipotálamo a las 5 semanas de haber inducido DM puede estar asociado con la hiperfagia que presentan los modelos animales de DM, como se ha sugerido previamente (Mao *et al.*, 2002; Sahu *et al.*, 1997). Este incremento ha sido relacionado a la deficiencia de insulina y leptina, e incremento en los niveles de grelina que ocurren durante la DM. Estas hormonas juegan un papel clave en la regulación de la expresión y secreción de neuropéptidos que controlan la conducta alimenticia (Gellin *et al.*, 2006; German *et al.*, 2010). Aunque son parámetros que no evaluamos en este estudio, en modelos experimentales de DM inducidos con STZ se ha demostrado que este fármaco provoca deficiencia de insulina debido al daño oxidativo inducido en las células β de los islotes de Langerhans, lo cual hace que algunas células como las del músculo, hígado y tejido adiposo sean incapaces de utilizar glucosa como fuente principal de energía, generando por lo tanto un estado de hiperglucemia crónica (Bolzán y Bianchi, 2002; Eleazau, *et al.*, 2013; Takasu, *et al.*, 1991). Como producto de la imposibilidad de las células para captar glucosa, ocurren varias alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas, favoreciendo la pérdida de peso, y al mismo tiempo disminución en los niveles de leptina (German *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 2006 y 2007).

Además de las señales hormonales, existen evidencias de que los nutrientes también pueden afectar la expresión de péptidos involucrados en la conducta alimenticia. Al respecto, algunos estudios han revelado que las células neuronales del hipotálamo pueden responder a la disponibilidad de glucosa y/o ácidos grasos presentes, por lo tanto, la hiperglucemia existente después del consumo de alimentos, tendría que ser una señal metabólica para que disminuya la expresión del NPY en el hipotálamo y favorecer la saciedad (Benani *et al.*, 2007; Leloup *et al.*, 2006), sin embargo, en la DM, la hiperglucemia es constante, y a pesar de ello, la expresión del NPY está aumentada, lo que nos indica que la alteración de otras moléculas como insulina y

leptina tienen un efecto importante en la regulación de la expresión del NPY; es por esto que se asume que el control del apetito es muy complejo y no depende de una sola señal (Quian *et al.*, 2002; Sohn, 2013).

El EAE incrementa el nivel del mensajero del NPY

Nosotros encontramos que el tratamiento de EAE provoca un incremento significativo en la expresión del NPY tanto en animales sanos como diabéticos, lo que sugiere que este antioxidante regula positivamente la expresión del mensajero de este péptido hipotalámico.

De acuerdo con estos resultados, investigaciones recientes proponen que los antioxidantes podrían tener efectos orexigénicos, al favorecer el incremento de péptidos relacionados con la inducción del apetito; mientras que las EROs se consideran como agentes anorécticos, dado que su incremento provoca la disminución de neuropéptidos asociados con la inducción de la ingesta de comida (Diano *et al.*, 2013; Drougard *et al.*, 2015; Hsieh *et al.*, 2006).

Los mecanismos exactos por los que las EROs y/o antioxidantes podrían estar regulando la expresión del NPY y de otras moléculas involucradas en el control de la ingesta de alimentos aún no están bien definidos, sin embargo, se ha descrito que el promotor del NPY contiene sitios de unión putativos para factores de transcripción que pueden ser afectados por estrés oxidativo tales como AP-1, AP-2 y Sp1 (Andersson *et al.*, 1994; Konigsberg, 2008; Minth y Dixon, 1990; Morel y Barouki, 1999). Asimismo, también se ha reportado que en el promotor del NPY, hay un elemento de respuesta para el factor de crecimiento nervioso (NGF, nerve growth factor), el cual, también se activa tanto por estrés oxidante y antioxidantes, y a la vez tiene un papel clave en la regulación positiva del NPY (Li *et al.*, 2000; Hounsom y Tomslinson, 2000). Lo anterior nos sugiere que la modulación de estrés oxidativo podría ser un factor importante para la regulación de la expresión del NPY (Tamas, *et al.*, 2008).

Por otra parte, en reportes previos se asocia el aumento en el nivel de expresión del NPY con hiperfagia y ganancia del PC; no obstante, en este estudio no se puede realizar esta asociación, ya que las ratas de los grupos control tratadas con el antioxidante no mostraron aumento en su PC comparadas con el grupo control no tratado. Los mecanismos exactos por los que el EAE puede controlar el PC, aún no están descritos con precisión, pero diversas investigaciones ha reportado que el ajo puede tener efecto anti-obesidad (Ambati., 2013; Soo *et al.*, 2010; Soon *et al.*, 2011; Thomson *et al.*, 2006).

Adicionalmente, el NPY ha sido considerado como un potente factor orexigénico, sin embargo, no es el único neuropéptido hipotalámico involucrado en la regulación de la ingesta de alimentos. También se encuentra la proteína relacionada a Agouti (AgRP) con efecto orexigénico; proopiomelanocortina (POMC) y transcrito relacionado a cocaína y anfetaminas (CART) con efectos anorexigénicos. Se sugiere que las neuronas que expresan a POMC son más susceptibles a alteraciones durante la DM ya sea por la hiperglucemia o por estrés oxidativo, por lo tanto, al haber alteraciones, o falla en su respuesta, la hiperfagia se presenta (Drougard *et al.*, 2014). Entonces, si el EAE pudiera proteger a estas neuronas, posiblemente sería el mecanismo por el que las ratas no se vuelven hiperfágicas con el tratamiento y controlan su PC.

Por último, diversos estudios han mostrado el efecto neuroprotector de sustancias con capacidad antioxidante, incluido el EAE; esto nos sugiere que el incremento en la expresión del NPY por EAE encontrado en el presente estudio, podría asociarse más bien a neuroprotección del animal diabético debido a que la unión del NPY a sus receptores disminuye el influjo de calcio intracelular, y evita la liberación de glutamato (Ariza *et al.*, 2011; Balasubramaniam, 2002; Ray *et al.*, 2011).

Los datos aquí mostrados nos sugieren que el EAE, al ser una sustancia con propiedades antioxidantes, puede estimular la expresión del ARNm del NPY. Si el aumento del NPY por EAE puede repercutir de forma negativa o positiva en la salud de ratas sanas o diabéticas, aún se desconoce, sin embargo, así como se ha relacionado con enfermedades del corazón, renales, gastrointestinales

(Chandrasekharan *et al.*, 2011; Ilhan *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2011; Matyal *et al.*, 2011; Milewikz *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 1999); también se ha demostrado su papel neuroprotector en patologías como Parkinson, Alzheimer, depresión, epilepsia (Ariza *et al.*, 2011; Balasubramaniam, 2002; Malva *et al.*, 2013). Por lo tanto, es necesario evaluar otros neuropéptidos y hormonas implicadas en la regulación del apetito para determinar con precisión el mecanismo de acción del ajo.

El nivel del mensajero de SOD2, CAT y GPx aumenta en hipotálamo de ratas diabéticas, mientras que el nivel de EROs se mantiene sin cambios.

No encontramos cambios significativos en el nivel de EROs en el hipotálamo de ratas diabéticas posiblemente porque las neuronas del hipotálamo expresan en mayor cantidad las proteínas desacoplantes UCP2, las cuales actúan como amortiguadores de EROs, por lo cual se considera que tienen alta capacidad antioxidante. Además, en modelos experimentales de DM2 se ha demostrado que hay incremento en la expresión de las UCP2 (Andrews *et al.*, 2008; Tamas *et al.*, 2008). Esta condición en las neuronas de hipotálamo podría prevenir el incremento en las EROs en forma excesiva, sin embargo, para comprobarlo será necesario realizar mediciones de los niveles de EROs en distintas regiones del cerebro diferentes del hipotálamo, o en otros órganos del animal diabético. Con los resultados obtenidos, no podríamos definir que no existe estrés oxidativo en ratas diabéticas, debido a que en nuestro grupo de trabajo hemos realizado evaluaciones del nivel de EROs en músculo de ratas con DM, y se ha demostrado la presencia de niveles elevados de EROs en diabéticas comparadas con ratas control (datos aún no reportados).

En lo que respecta a la expresión de las enzimas antioxidantes, encontramos un aumento significativo de SOD2, CAT y GPx. Este resultado sugiere que las células del hipotálamo están respondiendo de forma adecuada a los daños oxidantes provocados por la hiperglucemia. La sobreexpresión de estas enzimas puede ser producto de la activación de sus factores de transcripción sensibles a estrés oxidativo tales como Sp1, AP-1, Nrf2, NF1 (Konigsberg, 2008; Luna, 2007; Morel y Barouki, 1998), que son activados por niveles moderados de EROs.

En efecto, el nivel de EROs en ratas diabéticas no es superior al encontrado en ratas sanas y esto se asocia con el incremento en la expresión de las enzimas SOD2, CAT y GPx.

De manera adicional, en el hipotálamo, las EROs pueden ser generadas mediante la activación de la NADPHox por la insulina (Jaillard *et al.*, 2009), o en la cadena transportadora de electrones durante la fosforilación oxidativa, producto del metabolismo de los nutrientes disponibles (Benani *et al.*, 2007; Leloup *et al.*, 2006). Las ratas diabéticas inducidas con STZ, se caracterizan por ser deficientes en los niveles de insulina, por lo tanto, esto se convierte en un factor que impide el incremento de EROs en el hipotálamo de esas ratas (Jaillard *et al.*, 2009), y al mismo tiempo, se favorece al aumento en la expresión del NPY.

El EAE incrementa la expresión de enzimas antioxidantes y no altera el nivel de EROs.

Las ratas diabéticas a las que se les aplicó el tratamiento de EAE, mostraron incremento en la expresión de SOD2, CAT y GPx (200 mg de EAE/ kg PC vía i.p.), sin disminución en el nivel de EROs; mientras que en las ratas sanas observamos aumento en el nivel del ARNm de SOD1, SOD2, CAT y GPx, junto con disminución de EROs. Lo anterior nos sugiere que el EAE tiene el potencial de inducir la expresión de los mensajeros de enzimas antioxidantes, con lo cual se evita el incremento en el nivel de EROs y por lo tanto se impide el establecimiento del estrés oxidativo.

Diversos estudios sustentan que el incremento en las EROs están directamente relacionadas con la hiperglucemia (El-Bahr, 2013), y en nuestro estudio encontramos que la administración de 200 mg de EAE logró estabilizar los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas, por lo cual se esperaría que al haber control de los niveles de glucosa, haya también una disminución en la cantidad de EROs. Sin embargo, existe evidencia que indica que los efectos benéficos de los antioxidantes no solamente se basa en la capacidad para neutralizar las EROs sino también, tiene que ver con su habilidad para mejorar la capacidad antioxidante endógeno, tal como

se ve reflejado en el incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes SOD2, CAT y GPx en el modelo diabético.

El incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes por EAE podría ser debido a que en sus promotores se encuentran los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE), que son activados principalmente por el factor de transcripción Nrf2, el cual es activado y/o estabilizado por EAE y la SAC, y de esta manera inducir la expresión de las enzimas antioxidantes (Chen *et al.*, 2004; Colín *et al.*, 2010; Kalayarasan *et al.*, 2008; Kohda *et al.*, 2011).

El EAE tiene efecto anti-hiperglucemiante.

Finalmente, nuestro estudio reflejó que el EAE controla los niveles de glucosa sanguínea (efecto anti-hiperglucemiante). Thomson y colaboradores (2006a y 2007b), sugieren que la capacidad del ajo para controlar los niveles de glucosa, se debe a que la SAC puede estimular la liberación de insulina desde las células β remanentes y/o aumento de la sensibilidad de esta hormona sobre sus tejidos blanco (Eidi *et al.*, 2005; Thomson *et al.* 2006 y 2007).

Por otra parte, estudios realizados en nuestro grupo de trabajo, mostraron que el EAE administrado vía i.p. puede modificar la expresión de GLUT2 en hígado, GLUT1 y GLUT4 en músculo, GLUT1, GLUT3 y GLUT4 en cerebro. Por lo cual consideramos que la regulación de la expresión de los transportadores de glucosa puede ser uno de los mecanismos por los cuales el EAE tiene la capacidad de controlar las concentraciones de glucosa sanguínea (Barragán y Rodríguez, 2013; Blanco y Magallón, 2014; De la Cruz y Barrera, 2014).

Asimismo, en este estudio, la dosis ideal para controlar el nivel de glucosa fue de 200 mg por vía i.p., a su vez, fue la única que nos permitió observar cambios en la expresión de genes en hipotálamo, sugiriendo que dichos cambios en esta región cerebral, también pueden tener relación con la regulación de las concentraciones de glucosa sanguínea.

No se observaron cambios importantes mediante la administración de EAE por vía oral probablemente debido a procesos de absorción y eliminación durante su ingestión, mientras que la dosis más baja (100mg) aplicada por vía i.p. pudiera ser insuficiente para mejorar el estado diabético de las ratas a las que se les administró STZ.

En conclusión, la dosis más efectiva del EAE para inducir cambios en ratas diabéticas y que pueden estar asociados con la mejoría de las mismas es la de 200 mg administrada por vía i.p., ya que ejerce efecto anti-hiperglucemiante, existe una tendencia a evitar mayor pérdida de peso; además es capaz de incrementar el sistema de defensa antioxidante a nivel de ARNm en animales sanos y diabéticos, e incrementa la expresión del NPY, sin asociación a hiperfagia o aumento en el peso corporal en ratas sanas.

VII. AGRADECIMIENTOS



Al Dr. Moisés Rubio y la Dra. Sonia Galván del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por su asistencia en la capacitación para la disección del hipotálamo.



A la Dra. Lourdes Arriaga y al M.C. Esteban Domínguez del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades (Laboratorio de Inmunoquímica) por su apoyo en la capacitación de la citometría de flujo.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Cambios en glucosa sanguínea y PC antes de administrar cualquier tratamiento y después de inducir la DM.

A) Niveles de glucosa obtenidos después de inducir DM (%) Con STZ (Antes de iniciar el tratamiento con EAE)

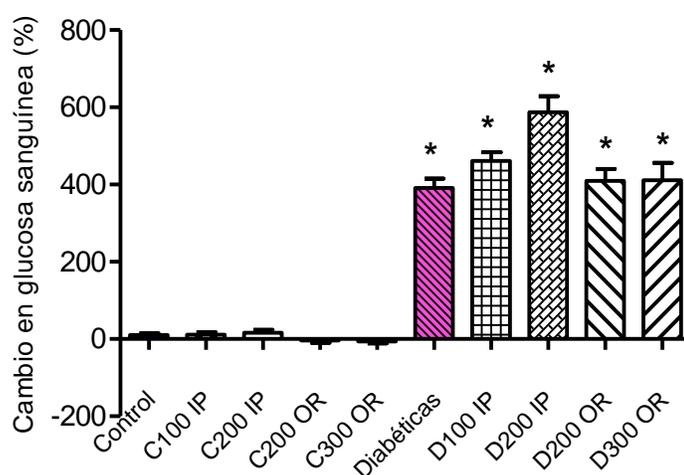


Figura 6. Niveles de glucosa sanguínea después de la inducción de la DM con STZ. Se muestran el cambio en los niveles de glucosa sanguínea en % (media±EE) en grupos control y experimentales después de 7 días de haber administrado la STZ (60 mg/kg de PC) a los grupos de ratas diabéticas. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100 mg de EAE/kg PC por IP; C200 IP, C200 OR, D200 IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC, vía IP u OR; C300 OR y D300 OR = 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control)

B) Peso corporal obtenidos después de inducir DM (%) Con STZ (Antes de iniciar el tratamiento con EAE)

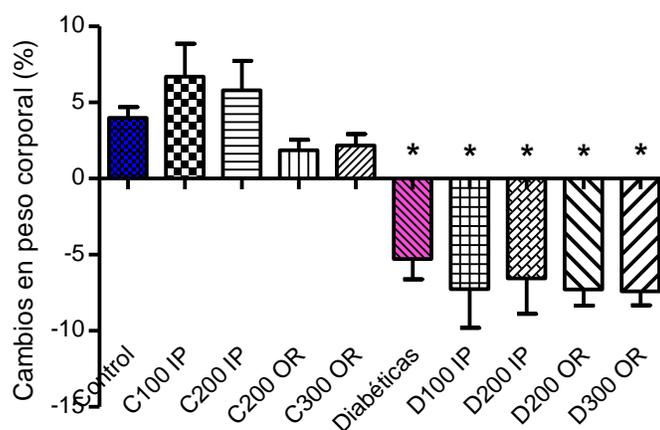


Figura 7. Cambios en el PC después de la inducción de la DM con STZ. Se muestran el cambio en el peso corporal en % (media±EE) en grupos control y experimentales después de 7 días de haber administrado la STZ (60 mg/kg de PC) a los grupos de ratas diabéticas. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100 mg de EAE/kg PC por IP; C200 IP, C200 OR, D200 IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC, vía IP u OR; C300 OR y D300 OR = 300 mg de EAE/kg PC por vía OR (p<0.05 *Diferente de Control)

ANEXO 2. Control positivo en la lectura del nivel de EROs con CellROX Green mediante citometría de flujo.

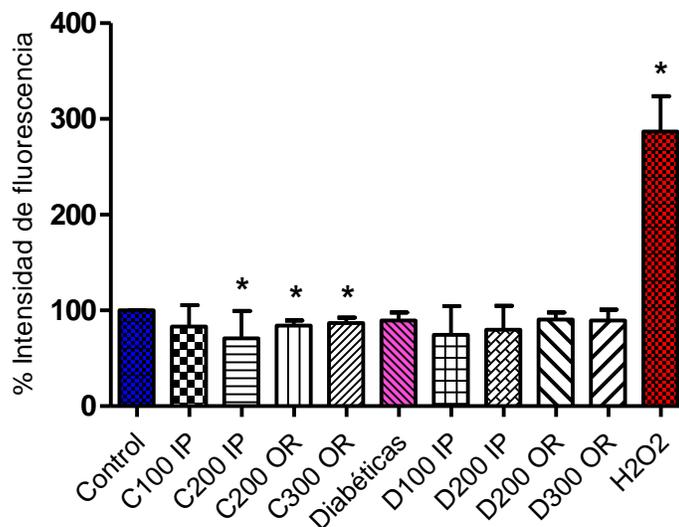


Figura 8. Control positivo con H_2O_2 en la medición del nivel de EROs en los grupos control y experimentales. C= Control; D=Diabéticas; C100 IP y D100 IP = 100mg de EAE/kg PC por vía intraperitoneal (IP); C200 IP, C200 OR, D200IP y D200 OR = 200 mg de EAE/kg de PC i.p. u oral (OR). C300 OR y D300 OR= 300 mg de EAE/kg PC por vía OR ($p < 0.05$ *Diferente de Control)

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambati S., 2013. Garlic derivatives: role in obesity and related disorders. *OA Biotechnology*, 14;2(1):1-5

American Diabetes Association (2014). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, 37:1 S81–S90.

Andersson G., Pahlman S., Parrow V., Johansson I., Hammerling U., (1994). Activation of the human *NPY* gene during neuroblastoma cell differentiation: Induced transcriptional activities of AP-1 and AP-2. *Cell Growth & Differentiation* 5:27-36.

Andrews, Z. B., Liu, Z. W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschöp M. H., Shanabrough M., Cline G., Shulman G. I., Coppola A., Gao X. B., Horvath T. L., and Diano S., (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, 454: 846–851.

Anwar, M.M., Meki, A.-R.M.A., (2003). Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 135: 539–547.

Ariza A., Andrade R., Aguilar L. A., (2011). Distribución hipocampal del Neuropeptido Y (NPY) en un modelo animal de demencia senil del tipo Alzheimer inducido por estreptozotocina. *ECIPERÚ*, 8:2, 172-175.

Arora S. and Anubhuti, (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity – A review. *Neuropeptides*, 40 375–401.

Balasubramaniam A., (2002) Clinical potentials of neuropeptide Y family of hormones. *The American Journal of Surgery*, 183: 430-434.

Barragán, B.M.I., Rodríguez, R.H.A., (2013). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel del mRNA de GLUT1 y GLUT4 en un modelo in vivo de diabetes mellitus (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.

Beagley, J., Guariguata, L., Weil, C., Motala, A. A., (2013). Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2013 for the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes Res. Clin. Pract.*,1872-8227

Benani A., Troy S., Carmona M., Fioramonti X., Lorsignol A., Leloup C., Casteilla L., Pénicaud L., (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing. *Diabetes*, 56:152–160.

Blanco Basilio y Magallón Tapia, (2014). Regulación de GLUT2 por extracto de ajo envejecido en un modelo in vivo de diabetes. Tesis de Licenciatura. Unidad

Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero

Bolzán A. D. and Bianchi M. S., (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research*, 512: 121-134.

Chandrasekharan B., Anitha M., Blatt R., Shahnava N., Kooby., Staley C., Mwangi S., Jones D. P., Sitaraman S. V., and Srinivasan S., (2011). Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterol Motil*, 23(2): 131–e26.

Chen C., Pung D., Leong V., Hebbar V., Shen G., Nair S., Li W., and Kong T., (2004). Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(10): 1578–1590.

Chomczynski P., and Sacchi N., (1993) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*, 162:156-159.

Colín-Gonzalez Ana L., Santana Ricardo A., Silva Islas Carlos A., Chánez-Cárdenas María E., Santamaría Abel and Maldonado Perla D., (2012). The Antioxidant Mechanism Underlying the Aged Garlic Extract- and S-Allylcysteine-Induced Protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (907162): 1-16.

De la Cruz Concepción B., Barrera Navarrete P., (2014). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre la expresión del mRNA de GLUT1 y GLUT3 en cerebro de ratas diabéticas. Tesis de Licenciatura. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero

Diano Sabrina (2013). Role of Reactive Oxygen Species in Hypothalamic Regulation of Energy Metabolism. *Endocrinol Metab*, 28:3-5

Drobiova H, Thomson M., Qattan K., Shalaby R. P., Amin Z. A., and Ali M., (2009). Garlic Increases Antioxidant Levels in Diabetic and Hypertensive. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 30-70.

Drougard A., Fournel A., Valet P., and Knauf C., (2015) Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Frontiers in Neuroscience*, 9 (56):1-12.

EI-Bahr S. M., (2013). Curcumin regulates gene expression of insulin like growth factor, B-cell CLL/lymphoma 2 and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Complementary & Alternative Medicine*, 13(368): 1-11

Eidi A., Eidi M., Esmaeili E. (2006). Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, 13: 624–629

Eleazu C. O., Eleazu . K. C., Chukwuma S., and Nelson E. U. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12:60, 1-7

Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2002). Oxidative stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23 599-622

Federación Internacional de Diabetes (Ed.) (2013). *Atlas de la Diabetes de la FID*, Sexta. ed.

Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. (1998). Farmacología humana. 3ª edic.. MASSON S. A., Barcelona.

Gehlert D. R. (2004). Introduction to the reviews on neuropeptide Y. *Neuropeptides*, 38 135–140

Gelling R. W., Morton G. J., Morrison C. D., Niswender K. D., Myers M. G., Rhodes C. J., Schwartz M. W. (2006). Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes, *Cell Metabolism*, 3, 67 - 73.

German J. P., Wisse B. E., Thaler J. P., Oh-I S., Sarruf D. A., Ogimoto K., Kaiyala K. J., Fischer J. D., Matsen M. E., Tabor sky G. J., Schwartz M. W., y Morton G. J. (2010). Leptin Deficiency Causes Insulin Resistance Induced by Uncontrolled Diabetes. *Diabetes*, 59:1626–1634.

Gutowski M., Kowalczyk S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance, *Act. Biochimica Pol.* 60:1 1-16

Hsieh Yih-Shou, Yang Shun-Fa, Chiou Hui-Ling, Kuo Dong-Yih (2006). Activations of c-fos/c-jun signaling are involved in the modulation of hypothalamic superoxide dismutase (SOD) and neuropeptide Y (NPY) gene expression in amphetamine-mediated appetite suppression, *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212: 99-109.

Hounsom L. and Tomlinson D. R. (2000). A Thioctic Acid-Gamma-Linolenic Acid Conjugate Protects Neurotrophic Support in Experimental Diabetic *Neuropathy. Antioxidants in Diabetes Management*, 11. P- 155-172

Ilhan A., Rasul S., Dimitrov A., Handisurya A., Gartner W., Baumgartner P. S., Wagner L., Kautzky-Willer A. , Base W. (2010). Plasma neuropeptide Y levels differ in distinct diabetic conditions. *Neuropeptides*, 44, 485–489

Jaillard T., Roger M., Galinier A., Guillou P., Benani A., Leloup C., Casteilla L., Pénicaud L., Lorsignol A., (2009) Hypothalamic Reactive Oxygen Species Are

Required for Insulin-Induced Food Intake Inhibition: An NADPH Oxidase–Dependent Mechanism. *Diabetes*, 58: 1544-1549

Jing Yu-Hong, Chen Kuan-Hsing, Kuo Pei-Ching, Pao Chia-Chi, Chen Jan-Kan (2013). Neurodegeneration in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Is Attenuated by Treatment with Resveratrol. *Neuroendocrinology*, 98:116–127

Johnson J. A., Johnson Delinda A., Kraft A. D., Calkins M. J., Jakel R. J., Vargar M. R., Chen P. C., (2008). The Nrf2-ARE Pathway: An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 61–69

Kalayarasan S., Sriram N., Sureshkumar A., Sudhandiran G., (2008). Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. *J. Appl. Toxicol*, 28: 908–919

Kohda K., Goda H., Itoh K., Samejima K., Fukuuchi T., (2013). Aged Garlic Extract Reduces ROS Production and Cell Death Induced by 6-Hydroxydopamine through Activation of the Nrf2-ARE Pathway in SH-SY5Y Cells. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 31-40

Königsberg F. M.. Radicales libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas, (2008). 1ª ed. *El Manual Moderno*

Kuhad, A. y Chopra K. (2007). Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: Behavioral and biochemical evidences. *European Journal of Phramacology*, 576 34-42

Leloup C., Magnan C., Benani A., Bonnet E., Alquier T., Offer G., Carriere A., Périquet A., Fernandez Y., Ktorza A., Casteilla L., Pénicaud L. (2006). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Required for Hypothalamic Glucose Sensing. *Diabetes*, 55, 2084-2090

Li B. S., Kramer P. R., Zaho W., Ma W., Stenger D. A. and Zhang L., Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Rat Homolog of Human AP-2a That Stimulates Neuropeptide Y Transcription Activity in Response to Nerve Growth Factor. *Molecular Endocrinology*, 14(6): 837–847

Livak K & Schmittgen T 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta (CT)) Method. *Methods*, 25 (4): 402-8.

Luna López Armando (2007). Mecanismos endógenos de generación de especies reactivas de oxígeno y respuesta celular antioxidante ante el estrés oxidativo. *Biblioteca virtual INGER, Instituto de Geriatria*, 93-102.

Malva J.O., Xapelli S., Baptista S., Valero J., Agasse F, Ferreira R., Silva A.P. (2013). Multifaces of neuropeptide Y in the brain – Neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation. *Neuropeptides*, 46 299–308

Mao F., Xiujun L., Min Z., Yang X. (2002). Increased expression of neuropeptide Y and its mRNA in STZ-diabetic rats. *Chinese Medical Journal*, 115 (5): 690-695.

Marques F. Z., Campain A. E., Davern P. J., Yang Y. H., Head G. A., Morris B. J. (2011). Global identification of the genes and pathways differentially expressed in hypothalamus in early and established neurogenic hypertension. *Physiol Genomics*, 43: 766–771

Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., Mohamed, J. (2012). The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.*, 12, 5–18.

Matyal R., Mahmood F., Robich M., Glazer H., Khabbaz K., Hess P., Bianchi C., Hagberg R., Xu Hu S., Sellke F. W., (2011). Chronic type II diabetes mellitus leads to changes in neuropeptide Y receptor expression and distribution in human myocardial tissue. *Eur J Pharmacol*, 665(1-3): 19–28.

Mendoza B.J.M., Mora P.A. (2012). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel del mRNA de GLUT4 en un modelo in vivo de diabetes mellitus (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.

Milewicz A., Mikulski E., Bidzinska B. (2000). Plasma insulin, cholecystokinin, galanin, neuropeptide Y and leptin levels in obese women with and without type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Obesity*, 24:2 152–153

Minth C. D., Dixon J. E. (1990). Expression of human neuropeptide y gene. *The Journal of Biological chemistry*, 265:22, 12933-12939.

Mora H., A.C., Aragon N., D.M., Ospina G., L.F. (2009). Oxidative stress characterization in streptozotocin-diabetic wistar rats. *Vitae, Rev. de la Facultad de Quím. Farmacéutica*, 16:3 311–319.

Morel Y., Barouki R., (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.*, 342, 481-496.

Muriach M., Flores-Bellver M., Romero F. J., Barcia J. M., (2014). Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:102158, p1-9.

Nelson, David L., Michael M. Cox: Lehninger, Principles of biochemistry (2005). 4^a ed. *W. H. Freeman and Company*.

Pandya R. S., Mao L., Zhou H., Zhou S., Zeng J., Popp A. J., Wang X. (2011). Central Nervous System Agents for Ischemic Stroke: Neuroprotection Mechanisms. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*,11(2): 81–97.

Quian S., Chen H., Weingarh D., Trumbauer M. E., Novi D. E., Guan X., Yu H., Shen Z., Feng Y., Frazier E., Chen A., Camacho R. E., Shearman L. P., Gopal T. S., MacNeil D. J., Van der Ploeg L. H., Marsh D. J., (2002). Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 22:14, p5027–5035

Ray B., Chauhan N. B., Lahiri D., (2011). Oxidative insults to neurons and synapse are prevented by Aged Garlic Extract (AGE) and S-allyl-L-Cysteine (SAC) treatment in the neuronal culture and APP-Tg mouse model. *J Neurochem*, 117(3): 388–402

Sahu A., Sninsky C. A., Kalra S. P., 1997. Evidence that hypothalamic neuropeptide Y gene expression and NPY levels in the paraventricular nucleus increase before the onset of hyperphagia in experimental diabetes. *Brain Research*, 755:339–342

Satoh C., Satoh F., Takahashi K., Murakami O., Sone M., Totsunne K., Yabe T., Ohneda M., Fokuda M., Sugimura K., Ogawa S., Nagakubo H., Sato T. y Mouri T. (1999). Elevated plasma immunoreactive neuropeptide Y concentrations and its increased urinary excretion in patients with advanced diabetic nephropathy. *Endocrine Journal*, 46:139-146.

Sohn J. W. (2013). Ion channels in the central regulation of energy and glucose homeostasis. *Frontiers of neuroscience*, 7:85, p1-10.

Soo-Jung Lee, Ra-Jeong Kim, Ji-Hyun Ryu, Jung-Hye Shin Min-Jung Kang In-Soo Kim and Nak-Ju Sung, 2010. Effects of the Red Garlic Extract for Anti-Obesity and Hypolipidemic in Obese Rats Induced High Fat Diet. *Journal of Life Science*, 21:2. 211-220

Soon Lee M., In-Hwan Kim, Chong-Tai Kim, and Yangha Kim, 2011. Reduction of Body Weight by Dietary Garlic Is Associated with an Increase in Uncoupling Protein mRNA Expression and Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diet-Induced Obese Mice. *The Journal Nutrition, Nutrition and Disease*, 141: 1947-1853.

Takasu N., Komiya I., Asawa T., Nagasawa Y., (1991) Streptozocin- and Alloxan-Induced H₂O₂ Generation and DNA Fragmentation in Pancreatic Islets: H₂O₂ as Mediator for DNA Fragmentation. *Diabetes*, 40,1141-1145

Tamas L. Horvath, Zane B. Andrews and Sabrina Diano (2008). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20:2 p78-87

Thomson M., Al-Qattan K. K., Bordia T., Ali M., (2006). Including Garlic in the Diet May Help Lower Blood Glucose, Cholesterol, and Triglycerides. *American Society for Nutrition*, 0022-3166/06. p. 800S-803s

Thomson M., Al-Amin Z. M., Al-Qattan K. K., Shaban L. H., Ali M. (2007). Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of garlic (*Allium sativum*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism*, 15: 108-115

Williams G., Bing G., Cai X. J., Harrold J. A., King P. J., Liu X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiology & Behavior*, 74 683–701