



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Phyllanthus niruri*
(EUPHORBIACEAE) SOBRE LA RETINA DE RATAS DIABÉTICAS
(Modalidad: Investigación)

AHIESKA AIMARA LISCANO CARREÑO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2008

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	iii
LISTA DE TABLA.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
Diseño experimental	6
Inducción de diabetes.....	7
Material vegetal	8
Preparación del extracto acuoso.....	8
Enucleación de los ojos.....	8
Determinación de proteínas	9
Actividad de enzimas antioxidantes.....	9
Superóxido dismutasa (SOD)	9
Catalasa (CAT)	10
Glutación reducido (GSH).....	11
Extracción y cuantificación de metalotioninas (MT).....	12
Determinación de la concentración de malonaldehído (MDA)	12
Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	13
Fracción proteica citosólica	13
Fracción proteica de membrana	14
Análisis estadísticos	16
RESULTADOS.....	17
Niveles de glucemia en ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>Phyllanthus niruri</i>	17
Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>P. niruri</i>	19

Actividad de la enzima catalasa (CAT) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>P. niruri</i>	21
Concentración de glutatión reducido (GSH) en el tejido retiniano de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>P. niruri</i>	23
Concentración de metalotioninas (MT) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>P. niruri</i>	24
Concentración de malonaldehído (MDA) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>P. niruri</i>	26
Contenido de proteínas en la fracción citosólica y de membrana del tejido retiniano de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de <i>P. niruri</i>	27
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	47
APÉNDICES	51

AGRADECIMIENTO

A Dios, por estar siempre conmigo, ser mi guía en cada paso de mi vida.

A mi Asesora, Dra. Mairin Lemus por su apoyo, confianza, orientación en la ejecución de este trabajo.

A mi Co-Asesora, Dra. Luz M. Rojas por su ayuda, orientación durante el desarrollo de la tesis.

A los profesores, M.Sc. Edgar Zapata, Lcdo. Iván Ramirez, M.Sc. José Véliz y M.Sc. Julio Armas por sus consejos y colaboración desinteresada en el préstamo de sus equipos y laboratorio para el análisis de algunas muestras.

En especial quiero agradecer a los profesores, Ángel Fariña, Cesar Grazziani y Aracelys Torres por su amistad y orientación a lo largo de mi carrera universitaria.

Un especial agradecimiento a mi compañera Yusmar Ramos y a mi amiga Gabriela Sánchez por el apoyo, colaboración incondicional durante todo el desarrollo de la experimentación.

A todos mis amigos (Marlene, María, Rosy, Mariana, Yari, Ruth, Darwin), a mi tía Nelly que estuvieron conmigo en las buenas y malas a lo largo de mi carrera de pre-grado y en general a todas aquellas personas que colocaron su granito de arena en mi vida.

Un especial agradecimiento a mis padres y a mi novio por apoyarnos y colaborar de alguna manera durante el proceso de experimentación.

A la profa. Tania Ramírez del Dpto. de Biología, al señor Juan C. Gutiérrez del depósito de biología y al señor José Brito del bioterio por su importante colaboración.

A la Lic. María José González y al laboratorio de materiales del Instituto Oceanográfico por su colaboración.

Al cuerpo de vigilancia por estar pendiente de nosotras durante las noches, fin de semana y días feriados.

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A Dios, por sobre todas las cosas.

A mis Padres Natividad y Leonides, por su amor, apoyo incondicional, comprensión, guía intelectual y moral.

A mis Hermanos Anibal y Alba, por su colaboración y estar siempre allí.

A mi novio Leonardo, por su apoyo, esfuerzo, amor y su constante motivación para que logre mis metas.

LISTA DE TABLA

Tabla 1 Representación esquemática del diseño experimental durante dos meses en los tiempos 15, 30, 45 y 60 días	7
--	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de glucemia final (mg/dl) en ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 18,26, $p < 0,01$; B: 30 días, KW: 21,16, $p < 0,001$; C: 45 días, KW: 21,44, $p < 0,001$; D: 60 días, KW: 19,22, $p < 0,001$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina. 18

Figura 2. Actividad de SOD (U/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 8,33, $p > 0,05$; B: 30 días, KW: 10,39, $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 6,78, $p > 0,05$; D: 60 días, KW: 16,53, $p < 0,01$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina. 20

Figura 3. Actividad de CAT (U/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 6,06; $p > 0,05$; B: 30 días, KW: 9,72; $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 18,85; $p < 0,001$; D: 60 días, KW: 19,86; $p < 0,001$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina. 22

Figura 4. Concentración de GSH (nmol/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 9,00, $p > 0,05$; B: 30 días, KW: 14,13, $p < 0,01$; C: 45 días, KW: 9,86, $p < 0,05$; D: 60 días, KW: 20,82, $p < 0,001$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina. 24

Figura 5. Concentración de MT (ng/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 10,21, $p < 0,05$; B: 30 días, KW: 11,43, $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 10,86, $p < 0,05$; D: 60 días, KW: 9,33, $p > 0,05$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina. 26

Figura 6. Concentración de MDA ($\mu\text{g/mg}$ de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 18,24, $p < 0,05$; B: 30 días, KW: 12,17, $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 5,51; $p > 0,05$; D: 60 días, KW: 8,40, $p > 0,05$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE:

normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes +
insulina. 27

Figura 7. Geles SDS-PAGE 15% a los 60 días de experimentación en las retinas de
ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. A: proteínas
citosolicas y B: proteínas de membrana. M: marcador, NA: normal + agua, NE:
normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes +
insulina. ↓: banda entre 50-77 KDa, *: par de bandas entre 50-77 KDa, Δ: banda
entre 34,3-50 KDa, ○: par de bandas de 34,3 KDa, ◇: banda entre 28,8-34,3 KDa y +:
banda entre 20,7-28,8 KDa. 30

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y las concentraciones de glutatión reducido (GSH), metalotionina (MT) y malonaldehído (MDA) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* o huevo escondido. Se formaron 5 grupos experimentales: dos grupos de ratas normales, uno con agua (NA) y otro con el extracto de la planta (NE) y tres grupos diabéticos, uno con agua (DA), uno tratado con el extracto (DE) y otro tratado con insulina (DI) para los 15, 30, 45 y 60 días de tratamiento. Se extrajeron las retinas y fueron homogenizadas en buffer fosfato, para las determinaciones espectrofotométricas de las enzimas SOD y CAT; del GSH; MDA; y la concentración de MT; y para la realización de una electroforesis SDS-PAGE 15% de las fracciones citosólicas y de membrana. El extracto acuoso de la planta *P. niruri* demostró un efecto hipoglucémico en los grupos de ratas tratados con el mismo. La actividad de la enzima SOD ($4,92 \pm 0,85$ U/mg de proteínas), así como del GSH ($0,85 \pm 0,22$ nmol/mg de proteínas) en las ratas diabéticas tratadas con el extracto de la planta a los 60 días, fueron similares o superiores a los grupos normales (SOD: $4,44 \pm 0,58$ U/mg de proteínas y GSH: $0,88 \pm 0,10$ nmol/mg de proteínas), estableciéndose un efecto antioxidante. En las ratas tratadas con insulina se observó que esta tiende a incrementar el estrés oxidativo al aumentar significativamente las concentraciones de GSH ($0,87 \pm 0,06$ nmol/mg de proteínas) y MT ($0,11 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) a los 45 días del bioensayo. En el grupo diabético sin tratamiento se observó un incremento altamente significativo en los niveles de CAT a los 60 días del experimento como mecanismo compensatorio a la hiperglucemia. En cuanto al MDA se observó diferencias significativas entre grupos solo a los 15 días del bioensayo, y a los 60 días las ratas diabéticas tratadas con insulina mostraron la concentración de MDA más elevada aunque no significativamente, para este parámetro el extracto de la planta no incrementó la peroxidación. En la electroforesis SDS-PAGE ocurrieron variaciones en la expresión de las bandas entre grupos que solo sugieren que pudiera haber alteraciones en algunas proteínas citoplasmáticas que podrían estar relacionadas con enzimas, factores proteicos u otras. Estos resultados sugieren que *P. niruri* ejerció efecto hipoglucémico y antioxidante en organismos diabéticos tratados con el mismo, contrarrestando los daños oxidativos en el tejido retiniano, estabilizando la defensa antioxidante del organismo.

Palabras claves: *Phyllanthus niruri*, diabetes, retina, estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

Desde antes de la Edad Media, los casos de diabetes habían sido muy aislados en periodos largos de tiempo, su difusión se dió a principios del siglo XIX hacia el oeste de Europa en su mayoría a personas de clase social alta; y su incidencia se ha incrementado en este siglo, probablemente debido al rápido cambio de estilos de vida, hábitos alimenticios, condiciones ambientales (Rocca y Plá, 1963; Berkow *et al.*, 1986; Mathews y Van, 2000). La diabetes tipo I suele desarrollarse antes de los 30 años de edad; mientras que la tipo II se desarrolla gradualmente, por lo común en personas con peso excesivo de más de 40 años de edad (Solomon *et al.*, 1998).

La diabetes es un problema de salud mundial, que resulta ser una de las principales causas de muerte. Afecta severamente procesos físicos y orgánicos, y su evolución podría modificar una variedad de componentes celulares, tales como alcaloides, glucósidos, polisacáridos, peptidoglicanos, hipoglicanos, glucopéptidos y terpenoides en numerosos puntos del cuerpo (Halim, 2002b); de igual modo es la principal causa de ceguera, trastornos renales, enfermedad de pequeños vasos sanguíneos, gangrena de las extremidades, neuropatías y otras disfunciones diversas (Solomon *et al.*, 1998).

La diabetes es un trastorno endocrino donde el estímulo hormonal, producido por la insulina para la utilización de la glucosa, es deficiente; así como diversas manifestaciones metabólicas y vasculares que se reflejan en un aumento de los niveles de glucosa en sangre. Este trastorno causado por la insulina no se trata de una sola enfermedad sino más bien de una familia de enfermedades (Berkow *et al.*, 1986).

La diabetes insulino dependiente, denominada también tipo I, muestra una notable disminución de células β pancreáticas, a menudo por una destrucción autoinmunitaria de las mismas. A nivel genético, algunas mutaciones de la estructura de la insulina pueden hacer que la hormona sea inactiva, y otras mutaciones causan defectos de la conversión de la proinsulina en la forma activa; por ello se administra insulina como tratamiento (Mathews y Van, 2000).

En la diabetes resistente a la insulina o tipo II, las células β secretan suficiente insulina, pero los receptores en las células blanco no pueden unirse a ella debido a mutaciones en estos

receptores, que además bloquean las actividades intracelulares que promueven la utilización de la glucosa (Solomon *et al.*, 1998).

De acuerdo a Rodríguez y Massera (1963), la diabetes puede afectar en su gran mayoría las estructuras del aparato ocular y se puede decir con certeza que mientras más avanzada esté la enfermedad, seguramente habrá alteraciones retinianas en mayor grado. La hiperglucemia causa muchas de las complicaciones de la diabetes incluyendo retinopatía, nefropatía, neuropatía, y daños macro y microvasculares (Evans *et al.*, 2002).

La localización más frecuente de las lesiones de origen diabético es en la retina, donde el daño tisular es lento e inexorablemente progresivo, terminando a menudo en ceguera por glaucoma absoluto. Otra localización no tan frecuente como importante es en el cristalino, donde puede producir trastornos reversibles (miopía) o irreversibles (cataratas), y otra localización bastante común ocurre a nivel de los nervios óculomotores produciendo neuritis, especialmente del tercer par (Rodríguez y Massera, 1963).

La retinopatía diabética (RD) es uno de los principales daños creados por la diabetes y se está convirtiendo en la mayor causa de ceguera en todo el mundo en edades comprendidas de 20 a 60 años. La pérdida de la productividad y la calidad de vida del paciente con RD pueden ocasionar un desborde socioeconómico adicional en la comunidad. Esta enfermedad es la causa de ceguera de un 5% aproximadamente de las personas ciegas en el mundo (Viswanath y Murray, 2003).

La RD se puede definir como una microangiopatía progresiva que se caracteriza por lesiones y oclusión de los vasos pequeños, donde las alteraciones bioquímicas y fisiológicas dan lugar a un engrosamiento basal del capilar y a una pérdida de pericitos, que son células contráctiles de la pared capilar situadas en el espesor de la membrana basal y que rodean en parte o en su totalidad a las células endoteliales (Ruíz, 1990). Las retinopatías y cegueras son debidas a la glucosilación de las proteínas retinianas y de anomalías microvasculares retinianas; además, la glucosilación de los residuos de lisina de las proteínas del cristalino causa formación de cataratas (Kelvin y Moss, 1992 (citados por Halim, 2002b); Kowluru, 2003).

La hiperglucemia genera autoxidación de glucosa y glucosilación autoxidativa de proteínas, las cuales podrían ser consideradas como una fuente combinada de generación de una cantidad adicional de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas del inglés) (Sasvári y Nyakas, 2003), así como de la lipoperoxidación, los cuales van a incrementar el estrés oxidativo, y éste va a jugar un rol importante en la patogénesis de las complicaciones diabéticas en los tejidos sensibles como células endoteliales capilares en la retina, células mesangiales en el glomérulo renal y neuronas y células de Schwann en los nervios periféricos, ya que no poseen un mecanismo eficiente para reducir el transporte de glucosa dentro de la célula (Evans *et al.*, 2002; Wolf, 1993 (citado por Pari y Latha, 2004); Brownlee, 2005). La retina es susceptible particularmente al estrés oxidativo por su alto consumo de oxígeno y alta proporción de ácidos grasos polinsaturados que la hace susceptible a la lipoperoxidación (Matsubara *et al.*, 2005; Beatty *et al.*, 2000 (citados por Jain, 2006)).

Las ROS formadas en el organismo producto de la diabetes pueden acarrear como producto final daño tisular, debido al colapso de la defensa del organismo ante el constante incremento del estrés oxidativo. Brownlee (2005), describió el daño a los tejidos producto del incremento de la producción de superóxido por la mitocondria debido a la hiperglucemia que ocasiona un colapso en la cadena transportadora de electrones, en la cual hay mayor cantidad de electrones donadores (NADH y FADH₂) los cuales bloquean al complejo III, ocasionando que los electrones se regresen a la coenzima Q, la cual dona los electrones uno a la vez a la molécula de oxígeno formando el radical superóxido. Este desbalance ocasiona la inhibición de la enzima glucolítica clave gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la cual activa las cuatro etapas consecutivas de alteraciones celulares endógenas, donde en la primera etapa se activa la ruta del sorbitol; en la segunda etapa hay producción intracelular de precursores finales de glucosilación avanzada (precursores AGE, siglas del inglés); en la tercera etapa se activa la proteína kinasa C (PKC); y en la última etapa se incrementa la actividad de la vía de la hexosamina (Anexo 1).

Para combatir a las ROS, los organismos tienen mecanismos de defensa de tipos enzimático y no enzimático (Sasvári y Nyakas, 2003). La alteración del balance del ciclo redox (Anexo 2) causada por la disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes como: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión s-transferasa (GST) y por ende el de la molécula

glutación reducido (GSH) podrían ser responsables de la inadecuada defensa antioxidante contra los daños mediados por las ROS (Pari y Latha, 2004).

La primera línea de defensa enzimática contra el radical superóxido está formada por las enzimas SOD. Estas enzimas catalizan la dismutación de difusión-limitada de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. La enzima SOD citosólica contiene los iones metálicos cobre y zinc (Cu/Zn – SOD) (Sasvári y Nyakas, 2003). El producto de la acción de la SOD va a ser el sustrato para la CAT, que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno H₂O₂, por lo que forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD y se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); y presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa (Venereo, 2002).

Entre los mecanismos de defensa no enzimáticos está el GSH, es el mejor antioxidante endógeno, el cual contrarresta los daños mediados por los radicales libres. Es bien conocido que esta biomolécula está envuelta en la protección de la estructura y función celular normal manteniendo la homeostasis redox, eliminando los radicales libres y participando en las reacciones de destoxificación (Mazunder *et al.*, 2005). Debido a que el estrés oxidativo está asociado a la peroxidación de lípidos celulares, esto puede ser determinado por el análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) (Mazunder *et al.*, 2005; Livingstone *et al.*, 1990).

Existen unas moléculas a las cuales actualmente se les ha atribuido la protección frente al estrés oxidativo así como las funciones fisiológicas de transporte y almacenamiento de metales esenciales (Zn, Cu) y la destoxificación de metales no esenciales, que son las llamadas metalotioninas (MT), y son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (6 – 8 000 Da), ricas en cisteína intracelular (30%) con el contenido de metal más alto conocido después de la ferritina (Viarengo *et al.*, 1997; Zangger *et al.*, 2001; Hidalgo, 2004).

Kowluru (2003), reportó que el tratamiento inmediato a la inducción de diabetes en ratas con el buen control de glucemia reducía los niveles de estrés oxidativo, así como el de nitrato; recordando que un elevado nivel de éstos en la retina está asociado al desarrollo de histopatologías. Existen trabajos donde tratan de explicar los diversos daños ocasionados por la diabetes a nivel del sistema metabólico tanto en humanos como en ratas diabéticas (Halim, 2002a; Kowluru, 2003 y Budak *et al.*, 2004).

El tratamiento más común para la diabetes es la insulina y varios tipos de agentes hipoglucémicos, los cuales tienen prominentes efectos secundarios tóxicos. Sin embargo, ni la insulina u otro fármaco moderno han demostrado modificar el curso de las complicaciones diabéticas (Halim, 2003). Es por esto la necesidad de buscar nuevos tratamientos que ayuden a revertir los daños ocasionados por tan dañina enfermedad.

Las plantas han sido usadas por siglos para el tratamiento de la diabetes, ya que ciertas plantas tienen un vasto potencial que sirven como agentes antidiabéticos o que proveen fuentes de materiales para drogas prototipos; es por esto que las plantas representan una vía en la búsqueda de nuevas drogas antidiabéticas (Halim, 2002a).

La planta *Phyllanthus niruri*, perteneciente a la familia Euphorbiaceae, conocida en nuestro país como “huevito escondido” o “flor escondida”, es un arbusto leñoso que crece de manera silvestre en las zonas tropicales por lo que es un cultivo sencillo y de muy bajo costo. *P. niruri* tiene una larga historia en los sistemas de medicina herbal en cada país tropical en donde esta crece. El remedio natural consiste básicamente de una infusión estándar o débil cocción de toda la planta, o de sus partes aéreas; la cual se emplea para el tratamiento de la diabetes, muchos tipos de condiciones biliares y urinarias, hipertensión, hepatitis, tuberculosis y muchos otros efectos (Taylor, 2003).

Con este trabajo se pretende encontrar una alternativa en la reversión de los daños a nivel del aparato ocular causados por la diabetes utilizando la planta *P. niruri*, midiendo su efecto sobre los parámetros antioxidantes del tejido con la esperanza de que sea un buen producto en el tratamiento o prevención de las alteraciones producidas en la retina producto de la hiperglucemia y no tenga significativos daños colaterales, ya que sería un avance en la ciencia así como en la industria farmacológica.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron 120 ejemplares juveniles machos de ratas (6 semanas de edad) de la especie *Rattus norvegicus* (cepa Sprague-Dawley) provenientes del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), que tienen la ventaja de presentar una vascularización retinal bajo condiciones de hiperoxia; y además el desarrollo de los vasos sanguíneos, el cual aumenta a partir de los precursores mesenquimáticos como ocurre en la retina de los humanos, y no del endotelio como en los conejos y los gatos; aunado a éstos, las similitudes morfológicas, bioquímicas y estructurales con la retina humana.

Los ejemplares fueron aclimatados por una semana en el bioterio del Departamento de Biología, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y fueron alimentados con dieta balanceada para roedores (ratarina), en las jaulas de acero inoxidable donde se alojaron las ratas, tenían un dispositivo que les permitió el consumo de agua y alimento *ad libitum* (Hnatyszyn *et al.*, 2002 y Miño *et al.*, 2002). Posteriormente, los animales se agruparon como se observa en la tabla 1 para la administración del extracto acuoso de *P. niruri* una vez confirmada la diabetes, estableciéndose este momento como tiempo cero. Este extracto se suministró a una dosis de 200 mg/kg de peso corporal, diluidos en el agua de consumo diario, durante un período máximo de 60 días; dosis que ha sido señalada por otros investigadores con alta actividad hipoglucemiante (Hnatyszyn *et al.*, 2002 y Mazunder *et al.*, 2005).

Así mismo, los ejemplares se organizaron en grupos de dos, con tres réplicas y se sacrificaron en número de seis durante los tiempos 15, 30, 45 y 60 días para un total de seis organismos por tratamiento, por lo que cada tratamiento estuvo conformado por veinticuatro individuos (Tabla 1). El tiempo de experimentación fue de un máximo de 60 días, porque a este tiempo se consideró que las alteraciones metabólicas en estos organismos serían significativas para dañar los tejidos retinianos, tanto bioquímica como citológicamente, por lo que no fue necesario llegar a una retinopatía proliferativa; sin embargo, se

han realizado estudios a nivel de retinopatía a los siete días de inducción (Miranda *et al.*, 2004) y de alteraciones metabólicas en la retina de dos meses de estudios (Kowluru *et al.*, 1998).

El grupo experimental diabético utilizado como control del efecto hipoglucemiante fue tratado con insulina de acción prolongada (zinc isofana humana) a una dosis de 5 unid/Kg peso corporal aplicado dos veces por semana.

Tabla 1 Representación esquemática del diseño experimental durante dos meses en los tiempos 15, 30, 45 y 60 días

Toma de muestra	Grupos Experimentales				
	Controles		Diabéticas		
	Agua	Extracto Acuoso	Agua	Extracto Acuoso	Insulina
	n=	n=	n=	n=	n=
15 Días	6	6	6	6	6
30 Días	6	6	6	6	6
45 Días	6	6	6	6	6
60 Días	6	6	6	6	6

Inducción de diabetes

La diabetes fue inducida en las ratas de 7 semanas de edad con aloxan que es un componente tóxico selectivo de las células beta pancreáticas con el propósito de destruir las células productoras de insulina e inducir un estado diabético insulino dependiente (Elsner *et al.*, 2006). El aloxan fue inyectado intraperitonealmente a una dosis de 100 mg aloxan/kg peso (60 mg/ml en buffer citrato-fosfato 0,1 mol, pH: 4,5); las ratas controles también se inyectaron con la misma cantidad de la solución buffer (modificación de Miranda *et al.*, 2004). El desarrollo de la diabetes se determinó por las observaciones de los síntomas de poliuria, polidipsia y polifagia; y verificado a los 2 días de la aplicación de la inyección por medición de los niveles de glucosa en sangre por una punción en la cola utilizando un glucómetro Prestige IQ. Las ratas fueron consideradas diabéticas cuando sus niveles glucémicos eran iguales o superiores a 200 mg/dl (Halim, 2002; Hnatyszyn *et al.*, 2002 y Viana *et al.*, 2004).

Material vegetal

Para la elaboración del extracto acuoso se colectaron plantas de la especie *Phyllanthus niruri* perteneciente a la familia Euphorbiaceae, la colecta de estos ejemplares se hizo desde febrero a abril del 2006, en los alrededores de la ciudad de Cumaná y en épocas vegetativas y reproductivas diferentes con la finalidad de evitar variaciones estacionales, fenológicas y ecológicas, controlando que no presentaran infección por bacterias, hongos o insectos, o presencia de parásitos. La identificación taxonómica de las plantas recolectadas se efectuó por comparación con los ejemplares depositados en el Herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero (I.R.B.R.) de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

La desecación del material vegetal colectado se hizo a temperatura ambiente para evitar cambios químicos en la planta, eliminando así la desecación por calor artificial. El material colectado se trasladó a un lugar sombreado y bien ventilado sin superponerlo, removiendo frecuentemente a fin de evitar fermentaciones enzimáticas que alteren la química de los ejemplares analizados. Después se procedió a pulverizar la planta por completo utilizando un molino eléctrico, para obtener el extracto crudo.

Preparación del extracto acuoso

De la planta cuidadosamente secada y pulverizada se tomaron 50 g y se agregaron en 1 000 ml de agua hirviendo y se permitió la extracción por 20 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a filtrar el extracto en papel Whatman # 1 (Hnatyszyn *et al.*, 2002). Para el cálculo de la concentración final del extracto se tomó 1 ml de la muestra y se evaporó completamente en una cocinilla, y se pesó el residuo sólido. El extracto se congeló hasta el momento de su uso (Viana *et al.*, 2004).

Enucleación de los ojos

Inmediatamente después de la muerte del animal por sobredosis de éter dietílico se enuclearon ambos ojos, con la finalidad de extraer el tejido retiniano. Luego de la obtención del tejido retiniano,

este se homogenizó en frío (con menos de una hora de ser extraído) con 1 ml de buffer fosfato 100 mmol a pH 7,2 conteniendo ácido etilendiamino-tetracetato (EDTA) 0,2 mmol y fue centrifugado a 2 000 x g/45 min y se mantuvo congelado hasta el momento de su uso (Kowluru *et al.*, 1997), que fue utilizado en la determinación bioquímica de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), de las biomoléculas glutatión reducido (GSH), las metalotioninas (MT) y el malonaldehído (MDA), así como el contenido de proteínas de la fracción citosólica y de membrana.

Determinación de proteínas

El contenido de proteínas en los extractos crudos de los homogenizados de las retinas de ratas fue determinado por el método de Bradford, añadiendo 50 µl de muestra o estándar (30 ng/dl) más 1 ml del buffer de trabajo de Bradford, se agitó por inversión y se dejó reposar por aproximadamente 10 min para ser leídas espectrofotométricamente en un espectral 21D (Milton Roy) a una longitud de onda de 595 nm (Bollag y Edelstein, 2000). Se determinó el contenido de proteínas por la aplicación de la fórmula:

$$\text{mg Proteína} = \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs estándar}} \times \text{Conc. estándar}$$

La actividad de las enzimas SOD y CAT, así como las concentraciones de GSH, MT y MDA fueron expresadas por el contenido en mg de proteínas en el homogenizado de retina.

Actividad de enzimas antioxidantes

La actividad de las enzimas antioxidantes se determinaron por métodos espectrofotométricos empleando productos de la casa comercial Oxis Internacional, Inc. de ensayos específicos, con el previo tratamiento del tejido retiniano con las condiciones necesarias para realizar las determinaciones enzimáticas.

Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de SOD fue evaluada de acuerdo al incremento de la tasa de autoxidación de R1 (5,6,6^a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxibenzo(c) fluoreno), mediado por la SOD en solución acuosa alcalina para producir un cromóforo con un máximo de absorbancia de 525 nm.

Los homogenizados de retinas de ratas bajo las distintas condiciones experimentales (250 µl), fueron pre-tratados con 400 µl del reactivo de extracción (etanol/cloroformo 62,5/37,5 (V/V) bien frío) para remover las interferencias de hemoglobina, los cuales se agitaron con Vortex por 30 seg, procediendo posteriormente a su centrifugación a 3 000 x g a 4°C x 5 min; se tomó 40 µl del sobrenadante y se mantuvo entre 2-8°C hasta 24 h para su análisis; a esta porción se le agregó 900 µl de buffer a 37°C previa saturación de oxígeno del mismo. Posteriormente, la interferencia dada por mercaptanos (RSH) como la glutatióna reducida, fue controlada por muestras pretratadas con 30 µl de R2 (1-metil-2-vinilpiridinio), el cual elimina directamente a los mercaptanos medida por una reacción rápida de alquilación dejándose incubar a 37°C/1 min. Luego se añadió 30 µl de R1 (5,6,6^a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidroxibenzo(c) fluoreno); transfiriendo la mezcla inmediatamente a una cubeta de espectrofotómetro midiéndose la absorbancia a 525 nm sobre el tiempo (cada 10 s/1 min). La actividad de SOD se determinó a partir de la relación de la tasa de autoxidación en la presencia de Vs (tasa del contenido de SOD en la muestra) y la ausencia de Vc (tasa del blanco donde SOD = 0) de SOD. La relación de Vs/c como una función de la actividad de SOD es independiente del tipo de SOD (Cu/Zn-SOD), Mn-SOD, Fe-SOD que ha sido medido. Una unidad de actividad de SOD se define como la actividad que duplica la tasa de autoxidación del blanco (Vs/Vc = 2), se expresó en U/mg de proteínas (Bioxytech[®] SOD-525[™] con número de catálogo 21010).

$$[\text{SOD}] = \frac{0,93 \times \left[\frac{V_s}{V_c} - 1 \right]}{1,073 - 0,073 \times \left[\frac{V_s}{V_c} \right]}$$

Catalasa (CAT)

Se evaluó por método colorimétrico y está basado en la reacción de la enzima con metanol en la presencia de una concentración óptima de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El formaldehído producido fue medido espectrofotométricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (purpald) usado como el cromógeno. Para esto se utilizó 30 μ l del estándar diluido o del homogenizado de retina en los tubos de ensayo, luego se les agregó 500 μ l del sustrato en cada tubo, dejando incubar a temperatura ambiente por 1 min exactamente, para agregarles 500 μ l del reactivo de parada a cada tubo, los cuales se cubrieron y mezclaron por inversión. Posteriormente a 20 μ l de cada mezcla de reacción se les agregó 2 ml del reactivo cromógeno/HRP, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min para luego leer la absorbancia a una longitud de onda de 520 nm (Bioxytech® Catalase-520TM con número de catálogo 21042). Para el cálculo de la concentración de CAT se hizo por extrapolación con la curva patrón que era inversamente proporcional a la absorbancia y se expresó en U/mg de proteínas (Anexo 3).

Glutación reducido (GSH)

La determinación de la concentración de GSH fue llevada a cabo de acuerdo con la técnica de Beutler *et al.* (1963), para lo cual se prepararon dos soluciones:

- Solución precipitante: 1,67 g de ácido metafosfórico glacial mezcla de HPO_3 y $NaPO_3$; 0,2 g de EDTA y 30 g de NaCl en 100 ml de agua destilada.
- Reactivo DTNB: 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzoico) al 0,4% en buffer fosfato, pH 7,5.

Se mezclaron 0,2 ml del sobrenadante de la muestra con 0,9 ml de agua destilada, se adicionó 1,5 ml de solución precipitante, se centrifugó a 4 000 x g durante 10 min y se dejó en reposo por un tiempo de 5 min. Posteriormente a 0,25 ml del sobrenadante se le añadió 1ml del reactivo DTNB, y se midieron inmediatamente en el espectrofotómetro. Se preparó un blanco de reactivo con 0,25 ml de agua destilada con 1 ml del reactivo DTNB. La densidad óptica fue medida a 412 nm espectrofotométricamente en un espectral 21D (Milton Roy). La estandarización del método se realizó con glutación (GSH; Sigma) y una curva patrón de 0,1 mmol/l (Anexo 4).

Extracción y cuantificación de metalotioninas (MT)

Al homogenizado destinado para la extracción de MT se le agregó 2-mercaptoetanol 10 mmol/l al buffer fosfato, estos fueron saturados con una solución de CdCl₂ de 0,5 ppm (0,2 ml/ml) durante 30 min a temperatura ambiente (Lacorn *et al.*, 2001), y fueron centrifugadas a 15 000 x g a 4°C, 1 h 30 min. Las concentraciones de cadmio determinadas a todas las fracciones obtenidas se hizo por espectrofotometría de absorción atómica, utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 3110, con llama aire acetileno y corrector de fondo de deuterio, a las respectivas longitudes de onda y slit (228,8 nm y 0,7 nm). Las concentraciones de MT en las fracciones fueron cuantificadas asumiendo para el cálculo que 7 átomos de Cd son ligados a la MT con una masa molar aparente de 12 000 g/mol, el volumen obtenido después de la centrifugación (VDC), y el volumen transferido a la espectrofotometría de absorción atómica (VTC). Los niveles de MT son expresados en base a las proteínas del extracto crudo antes de la saturación, determinadas por el método de Bradford. Las concentraciones fueron calculadas como:

$$\text{MT } (\mu\text{g/ mg p.t.}) = \frac{\alpha \times M_{\text{MT}} \times \text{DC}}{M_{\text{Cd}} \times \text{VTC} \times 7 \rho}$$

donde:

α : representa la concentración de cadmio ($\mu\text{g/l}$).

M_{MT} : masa molar de MT 12 000 g/mol.

M_{Cd} : masa molar de Cd 112,4 g/mol.

7: número de átomos de Cd limitados a Mt.

ρ : concentración de proteínas del extracto crudo (Lacorn *et al.*, 2001)

Determinación de la concentración de malonaldehído (MDA)

Éste es un método sensible y reproducible utilizado como indicador de la PL. El principio de este ensayo fue medir la producción de uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos, el

malonaldehído (MDA). La descomposición de los hidroperóxidos genera MDA, el cual puede reaccionar con TBA para formar un complejo TBA-MDA-TBA que tiene un pico de absorbancia a 532-535 nm. Este complejo también tiene un máximo de excitación fluorescente a 532 nm y un máximo de emisión fluorescente a 553 nm (Livingstone *et al.*, 1990).

La reacción del TBA con MDA ocurre a pH ácidos (1,5-3,0), y está influenciada por la presencia de ácidos en la solución (HCl, ácido perclórico, ácido fosfórico y otros), y posiblemente también por la fuerza iónica. La oxidación de ADN, nucleótidos, azúcares y varios aminoácidos también genera MDA como producto.

La técnica constó de colocar en tubos eppendorf de 1,5 ml, 250 μ l del homogenizado de retinas de ratas bajo las distintas condiciones experimentales, siendo estos y la curva patrón (20 mmol/l) incubados en baño de agua a 37°C con agitación constante durante 15 min, al terminar el tiempo los mismos fueron retirados del baño de agua y se colocaron en un baño de hielo, adicionando en cada tubo 250 μ l de solución de parada frío (12,5 g de ácido tricloroacético (TCA), 100 ml de agua destilada y 6,61 ml de HCl 1,0 mol/l) para detener la reacción, luego a cada tubo se le añadió 500 μ l de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1% (1 g TBA y 100 ml de agua destilada), se agitaron los tubos y se procedió a colocarlos en baño de agua a 90°C, con agitación constante, por 10 min; posteriormente fueron retirados del baño de agua y colocados nuevamente en baño de hielo por unos minutos para ser enfriados y luego ser centrifugados a 1 500 x g por 10 min a 4°C; el sobrenadante se transfirió a la celda del espectrofotómetro (heyos) con ayuda de una pipeta pasteur y se leyó a una longitud de onda de 532 nm. Se determinó la concentración de proteínas totales en el sobrenadante y la concentración de lipoperóxidos se expresó en μ g de MDA por mg de proteína (Anexo 5).

Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Fracción proteica citosólica

Para esta fase se tomaron 75 μ l del homogenizado de retina de ratas bajo las distintas condiciones experimentales a los 60 días del bioensayo y se les añadió 25 μ l de buffer muestra (buffer

hidroximetilmetilamina (Tris-HCl) 0,5 mol/l a pH 6,8, glicerol, solución dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, 2-b-mercaptoetanol, azul bromofenol al 0,05% y agua destilada), mezclándose y calentando por cinco minutos a baño de maría; posteriormente se refrigeraron hasta la posterior corrida electroforética.

Fracción proteica de membrana

Se tomó el precipitado del homogenizado de retina de ratas bajo las distintas condiciones experimentales a los 60 días de tratamiento y se lavó dos veces con 200 μ l de buffer fosfato salino a pH 8,6 y se centrifugó a 3 000 x g por 10 min. Al precipitado se le agregó 100 μ l de buffer lisis tritón X-100 al 0,15% y se incubó en hielo por 30 min.

Las diferencias en el contenido de proteínas de la fracción citosólica y de membrana del tejido retiniano, se hizo a partir de geles SDS-PAGE 15%, tris 0,375 mol/l a pH 8,8 los cuales para su preparación se realizó una mezcla de 3,5 ml de agua destilada, 2,5 ml buffer Tris-HCl a 1,5 mol/l a pH 8,8, 100 μ l de solución SDS al 10% (a temperatura ambiente), 4 ml de acrilamida/Bis (30%) (llevado a temperatura ambiente >15 minutos), 50 μ l de persulfato de amonio al 10% (fresco diariamente) y 10 μ l de N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED), mezclándose y añadidos inmediatamente a los moldes, al transcurrir 6 min en la parte superior se les agregó suficiente agua con sumo cuidado para nivelar los bordes. Al gelificar se retiró el agua y se le agregó una mezcla de gel 5%, Tris a 0,125 mol/l a pH 6,8 que contenía 3,05 ml de agua destilada, 1,25 ml de buffer Tris-HCl 0,5 mol/l a pH 6,8, 50 μ l de SDS al 10%, 800 μ l de acrilamida/bis (30%) (temperatura ambiente por 15 min), 25 μ l de persulfato de amonio al 10% (fresco diariamente) y 10 μ l de TEMED, inmediatamente se introdujeron en el molde los peines, evitando dejar burbujas de aire y se dejó gelificar, luego se retiraron los peines y se le agregó agua guardándose en la nevera hasta su posterior corrida.

Para la corrida electroforética, en el primer bolsillo (de izquierda a derecha) se agregó 5 μ l del marcador de bajo peso molecular, y en los demás se agregaron 30 μ l de la muestra ya preparada de cada una de las condiciones experimentales con el mismo contenido de proteínas (32,4 ng de proteínas); se preparó la cámara con buffer de corrida a una dilución de 1:5. Se inició la corrida con una energía de aproximadamente de 60 V hasta que las muestras se empacaran (aproximadamente 10 min) y luego se

aumentó a 120 V. El tiempo usual de corrida fue de 45 min aproximadamente. Utilizando como marcador molecular a Rad- 161-0305U: fosforilasa 103 000, albúmina de suero de bovino 77 000, ovoalbúmina 50 000, anhidrasa carbónica 34 300, inhibidor de tripsina de grano de soya 28 800 y lisozima 20 700.

El revelado de las corridas se realizaron por coloración de plata y esta constó de varios pasos:

Primero: se colocó el gel de poliacrilamida en un envase plástico y se cubrió de 3 a 5 veces el volumen del gel con solución fijadora que no es más que una mezcla de metanol 50% (V/V), ácido acético 10% (V/V) y agua 40%; y se agitó lentamente por 30 min en un agitador orbital.

Segundo: se sacó de la solución fijadora y se cubrió el gel 5 veces el volumen con solución de desteñimiento (ácido acético al 7% (V/V), metanol 5% (V/V) y agua 88%) por 60 min y se agitó lentamente.

Tercero: se sacó de la solución de desteñimiento. Se le agregó 5 veces el volumen de glutaraldehído al 10% y se agitó lentamente por 30 min en la campana.

Cuarto: se retiró de la solución de glutaraldehído. El gel se lavó más de cuatro veces con agua con más de 30 min c/u. Se agitó lentamente.

Quinto: se sacó del agua. Se equilibró el gel cubriéndolo con solución de nitrato de plata amoniacal (3,5 ml de amoníaco (NH_4OH) al 30% en 42 ml de hidróxido de sodio al 0,36% y llevado a un volumen de 200 ml con agua, se tituló lentamente con 8 ml de nitrato de plata al 19,4%) por 15 min y se agitó vigorosamente.

Sexto: se transfirió el gel a otro envase de plástico y se lavó 5 veces con agua desionizada, exactamente por 1 min c/u, se agitó lentamente.

Séptimo: se diluyó 25 ml de la solución de desarrollo (0,5 g de citrato de sodio (0,5% m/V), 0,5 ml de solución de formaldehído al 37% y 100 ml de agua) con 500 ml de agua. Se transfirió el gel a otro

envase plástico, se le añadió suficiente solución de desarrollo hasta cubrir el gel, y se agitó bien hasta que las bandas obtuvieran la intensidad deseada. El gel se guardó en ácido acético al 7% (Bollag y Edelstein, 2000).

Por último los geles fueron fotografiados con una cámara digital Lumix modelo DMC FZ30.

Análisis estadísticos

Las variables medidas se sometieron a un análisis de Kruskal Wallis (K.W.), a un nivel de confianza de 95%, a fin de determinar si existen diferencias significativas entre las medianas según los tratamientos propuestos, ya que los datos no eran homogéneos. En los casos donde se encontró diferencias significativas se realizó la prueba *a posteriori* de rangos múltiples, para ver el comportamiento y diferencias de los grupos experimentales, mediante la comparación múltiple de medias.

Se realizó un análisis de K.W. de una vía en cada tiempo, debido a que las varianzas resultaron no ser homogéneas durante toda la experiencia.

Los datos fueron expresados en figuras de caja y bigote (Anexo 6).

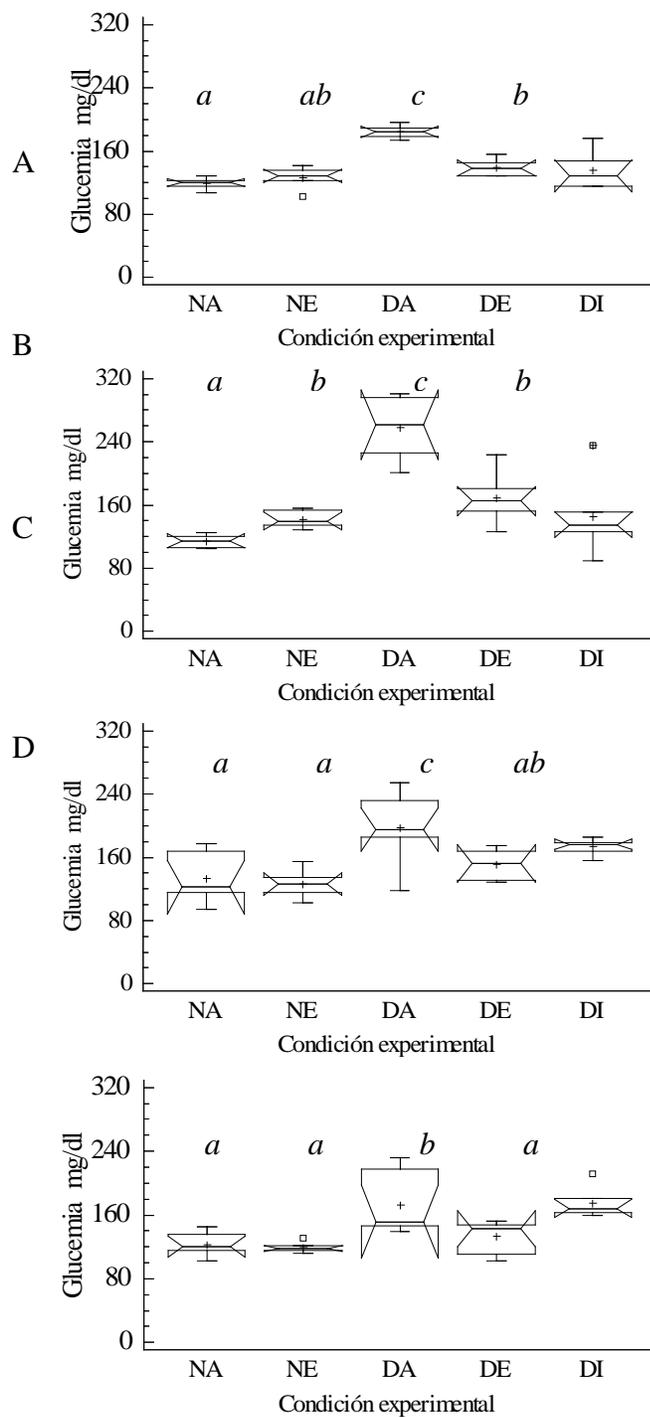
RESULTADOS

Niveles de glucemia en ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*

En la figura 1A y apéndice 1A se observa que existen diferencias estadísticamente muy significativas (KW: 18,26; $p < 0,01$) entre el grupo control quien presentó los niveles glucémicos más bajos ($119,00 \pm 7,56$ mg/dl) y el resto de los grupos; entre las ratas diabéticas sin tratamiento las cuales tenían los niveles de glucosa más alto ($184,17 \pm 7,83$ mg/dl) con el resto de las condiciones experimentales, y entre el grupo diabético tratado con el extracto de *P. niruri* ($139,17 \pm 11,23$ mg/dl) con el grupo control y el diabético sin tratamiento. A los 30 días del bioensayo las ratas diabéticas sin tratamiento presentaron los niveles glucémicos más elevados ($257,83 \pm 39,18$ mg/dl) existiendo diferencias altamente significativas (KW: 21,16; $p < 0,001$) con el resto de los grupos. También se pudo observar que el extracto acuoso de la planta para este tiempo no ejerció efecto hipoglucemiante ni en el grupo normal ($142,00 \pm 10,58$ mg/dl) ni en el diabético ($168,67 \pm 32,35$ mg/dl) teniendo el grupo control niveles más bajos ($114,17 \pm 7,78$ mg/dl) (figura 1B, apéndice 1B).

A partir de los 45 días, el extracto acuoso de la planta comenzó a bajar los niveles glucémicos comparables con el grupo control ($133,00 \pm 32,40$ mg/dl), tanto en las ratas normales con $125,18 \pm 18,32$ mg/dl como en las ratas diabéticas con $151,33 \pm 19,87$ mg/dl; mientras que el grupo diabético al que se le suministró insulina tendió a elevar su nivel glucémico ($173,50 \pm 10,21$ mg/dl) por encima del grupo control. Las ratas diabéticas sin tratamiento mantuvieron los niveles de glucosa elevados ($210,00 \pm 27,80$ mg/dl) teniendo diferencias con el resto de los grupos aunque en menor proporción que el muestreo anterior (KW: 21,44; $p < 0,001$) (figura 1C, apéndice 1C).

Figura 1. Niveles de glucemia final (mg/dl) en ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 18,26, $p < 0,01$; B: 30 días, KW: 21,16, $p < 0,001$; C: 45 días, KW: 21,44, $p < 0,001$; D: 60 días, KW: 19,22, $p < 0,001$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.



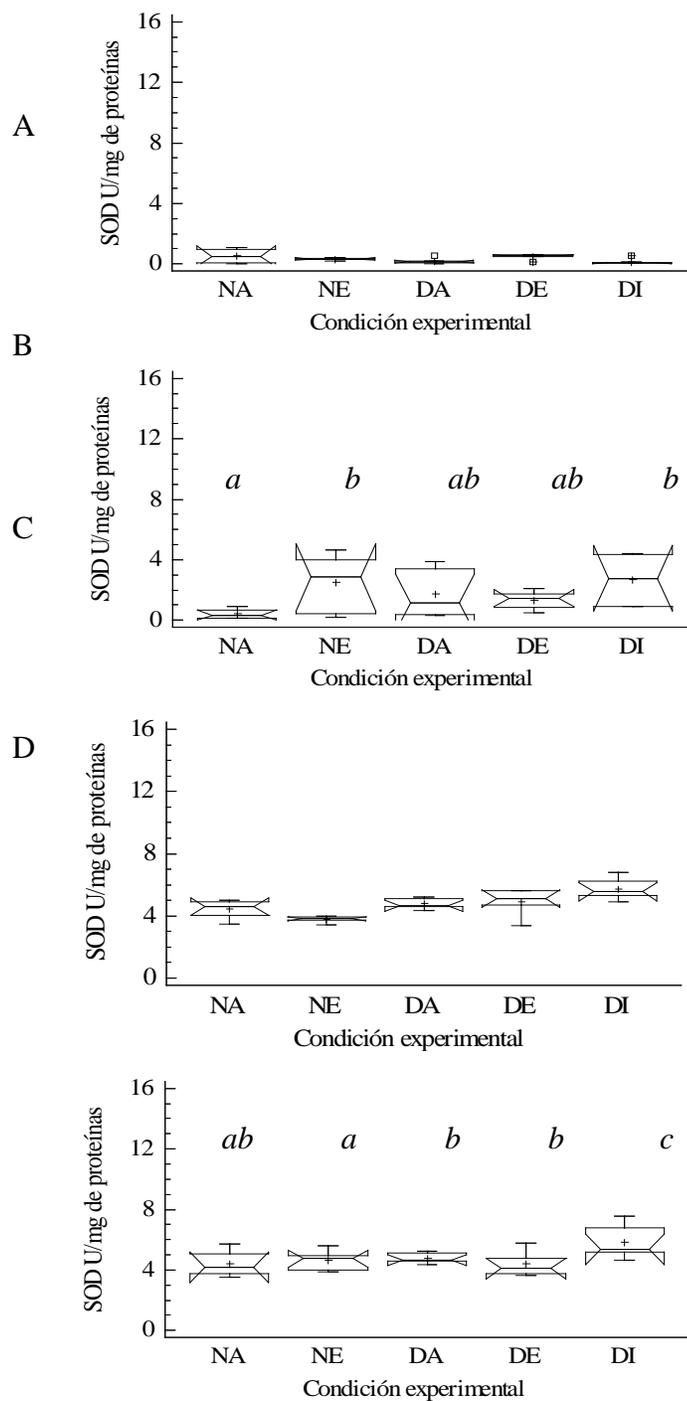
Al final del experimento, a los 60 días se encontró una diferencia altamente significativa entre los grupos con un KW: 19,22; $p < 0,001$; las ratas diabéticas sin tratamiento mantuvieron los niveles de glucosa sanguínea más elevada ($173,00 \text{ mg/dl} \pm 40,88$) que el resto de los grupos, el grupo diabético tratado con insulina mantuvo el comportamiento de incremento de los niveles glucémicos ($175,17 \pm 19,60 \text{ mg/dl}$) aún más altos que los organismos sin tratamiento. El extracto acuoso de *P. niruri* mantuvo el efecto hipoglucémico en los dos grupos tratados con el mismo (NE: $119,00 \pm 6,60 \text{ mg/dl}$; DE: $132,83 \pm 21,01 \text{ mg/dl}$), comparándose estos valores con los del grupo control que estuvieron en $123,00 \pm 15,45 \text{ mg/dl}$ no existiendo diferencias entre ellos (figura 1D, apéndice 1D).

Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *P. niruri*

En la figura 2, se observa la actividad de SOD en U/mg de proteínas de los homogenizados de retina de ratas bajo las distintas condiciones experimentales, a los 15 días no se encontró diferencias significativas (KW: 8,33; $p > 0,05$) con una actividad de la enzima entre 0,04-1,09 U/mg de proteínas; en las ratas tratadas con insulina esta enzima estuvo casi inhibida ($0,16 \pm 0,22 \text{ U/mg de proteínas}$), aún por debajo de las ratas diabéticas controles ($0,19 \pm 0,19 \text{ U/mg de proteínas}$), observando un ligero incremento en las diabéticas tratadas con el extracto ($0,49 \pm 0,17 \text{ U/mg de proteínas}$) casi igualando al grupo normal control ($0,52 \pm 0,53 \text{ U/mg de proteínas}$) (figura 2A, apéndice 2A).

A los 30 días del bioensayo hubo diferencias estadísticamente significativas (KW: 10,39; $p < 0,05$) formándose dos grupos después de la prueba *a posteriori*, encontrándose diferencias significativas entre el grupo normal control ($0,41 \pm 0,31 \text{ U/mg de proteínas}$) con los grupos: normal con el extracto de *P. niruri* ($2,49 \pm 1,82 \text{ U/mg de proteínas}$) y diabético con insulina ($2,66 \pm 1,63 \text{ U/mg de proteínas}$), presentando estos últimos mayor actividad de SOD (figura 2B, apéndice 2B).

Figura 2. Actividad de SOD (U/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 8,33, $p > 0,05$; B: 30 días, KW: 10,39, $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 6,78, $p > 0,05$; D: 60 días, KW: 16,53, $p < 0,01$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.



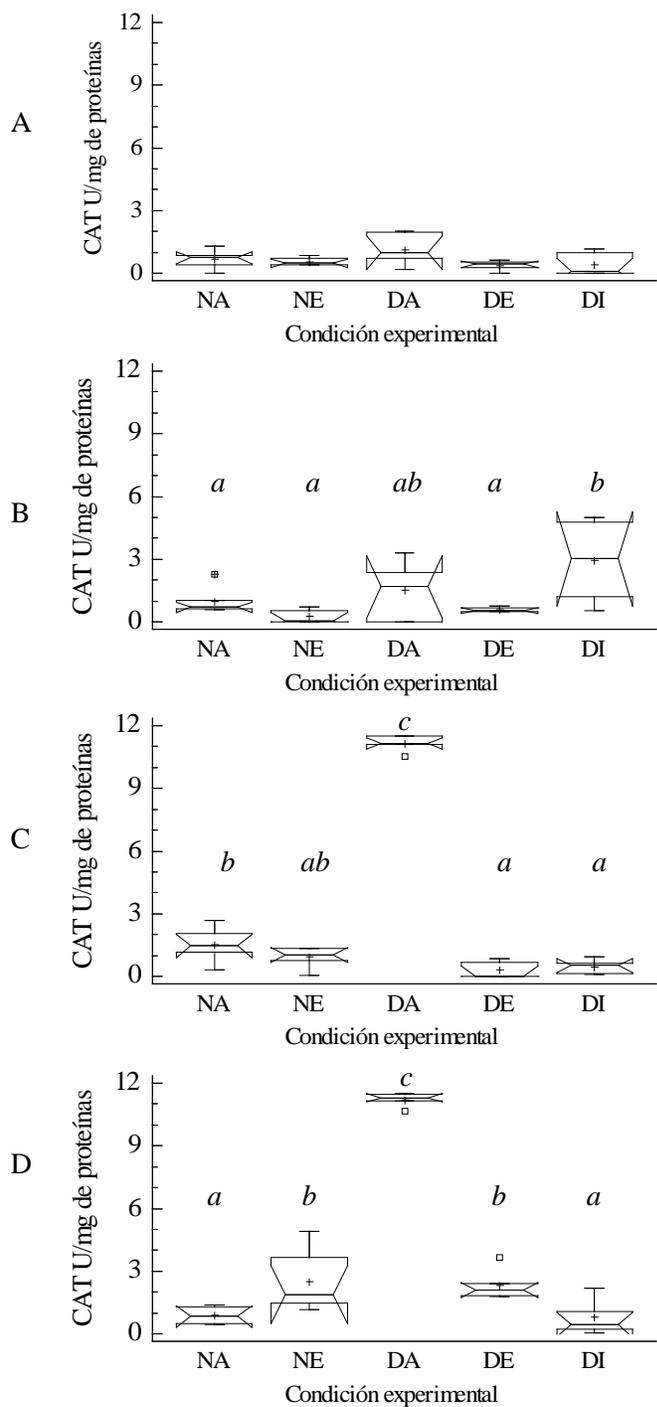
En la figura 2C (apéndice 2C) se observa que la actividad de la enzima aumentó en todos los grupos, pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa (KW: 6,78; $p > 0,05$) el grupo diabético tratado con insulina fue el que presentó mayor actividad enzimática ($5,81 \pm 1,12$ U/mg de proteínas) a los 45 días del experimento. Luego a los 60 días del bioensayo (figura 2D, apéndice 2D) se encontró una diferencia muy significativa (KW: 16,53; $p < 0,01$), entre el grupo de ratas tratadas con insulina, siendo este el que presentó mayor actividad de SOD ($11,00 \pm 2,47$ U/mg de proteínas), con el resto de las condiciones experimentales.

Actividad de la enzima catalasa (CAT) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *P. niruri*

En los primeros 15 días de bioensayo no se encontró diferencias significativas (KW: 6,06; $p > 0,05$) entre las medianas de cada uno de los grupos experimentales (figura 3A , apéndice 3A); en el segundo muestreo hubo diferencias significativas (KW: 9,72; $p < 0,05$) entre el grupo diabético tratado con insulina ($2,93 \pm 2,10$ U/mg de proteínas) y el resto de las condiciones experimentales (figura 3B, apéndice 3B); a partir de los 45 días se observó diferencias estadísticas altamente significativas (KW: 18,85; $p < 0,001$), entre el grupo normal control ($1,52 \pm 0,81$ U/mg de proteínas) con los grupos diabéticos (DA: $11,15 \pm 0,39$ U/mg de proteínas, DE: $0,32 \pm 0,41$ U/mg de proteínas, DI: $0,46 \pm 0,36$ U/mg de proteínas), entre las ratas diabéticas controles, quienes mostraron la actividad de CAT más alta ($11,15 \pm 0,39$ U/mg de proteínas) con el resto de los grupos experimentales (figura 3C, apéndice 3C).

A los 60 días, también se encontró diferencias altamente significativas (KW: 19,86; $p < 0,001$) entre el grupo diabético sin tratamiento ($11,21 \pm 0,35$ U/mg de proteínas) con el resto de los grupos, quien mantuvo elevado la actividad de CAT respecto a los demás, entre los grupos: normal control ($0,89 \pm 0,46$ U/mg de proteínas) y diabetes con insulina ($0,79 \pm 0,87$ U/mg de proteínas) con los demás grupos y entre los

Figura 3. Actividad de CAT (U/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 6,06; $p > 0,05$; B: 30 días, KW: 9,72; $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 18,85; $p < 0,001$; D: 60 días, KW: 19,86; $p < 0,001$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.



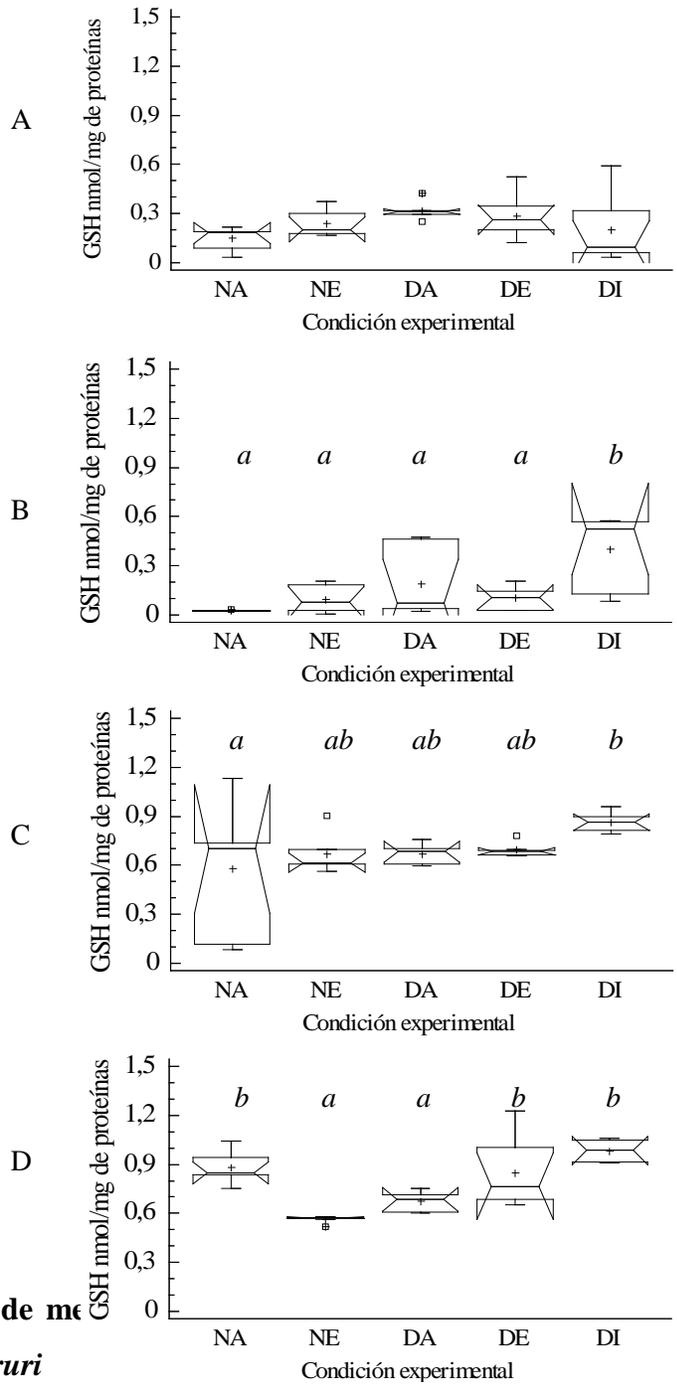
grupos tratados con el extracto tanto normal como diabético con los grupos: normal control, diabetes sin tratamiento y diabetes con insulina (figura 3D, apéndice 3D).

Concentración de glutatión reducido (GSH) en el tejido retiniano de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *P. niruri*

A los 15 días de tratamiento no hubo diferencias estadísticamente significativas (KW: 9,00; $p > 0,05$) (figura 4A, apéndice 4A). Luego a los 30 días de bioensayo (figura 4B, apéndice 4B), se observó la formación de dos grupos producto de la prueba *a posteriori*, encontrándose diferencias muy significativas (KW: 14,13; $p < 0,01$), entre el grupo diabético con insulina ($0,40 \pm 0,23$ nmol/mg de proteínas) teniendo la concentración de GSH más alta en la retina con el resto de los grupos experimentales. La concentración de GSH incrementó en todas las condiciones experimentales a los 45 días de experimentación y presentaron diferencias significativas (KW: 9,86; $p < 0,05$), entre las ratas controles ($0,58 \pm 0,41$ nmol/mg de proteínas) y las diabéticas tratadas con insulina ($0,86 \pm 0,06$ nmol/mg de proteínas) (figura 4C, apéndice 4C).

A los 60 días de experimentación se encontró diferencias altamente significativas (KW: 20,82; $p < 0,001$), entre los grupos: normal agua ($0,88 \pm 0,10$ nmol/mg de proteínas), diabetes con extracto ($0,85 \pm 0,22$ nmol/mg de proteínas) y diabetes tratado con insulina ($0,98 \pm 0,07$ nmol/mg de proteínas) con el resto de los grupos (figura 4D, apéndice 4D). Además el grupo de ratas al cual se le suministró la insulina obtuvo la mayor concentración de GSH ($0,98 \pm 0,07$ nmol/mg de proteínas) y se pudo observar en esta última figura que el extracto acuoso de *P. niruri* ejerció acción antioxidante para dicha biomolécula incrementando su concentración e igualándose a los parámetros normales, contrario a lo ocurrido en las ratas diabéticas sin tratamiento.

Figura 4. Concentración de GSH (nmol/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 9,00, $p > 0,05$; B: 30 días, KW: 14,13, $p < 0,01$; C: 45 días, KW: 9,86, $p < 0,05$; D: 60 días, KW: 20,82, $p < 0,001$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

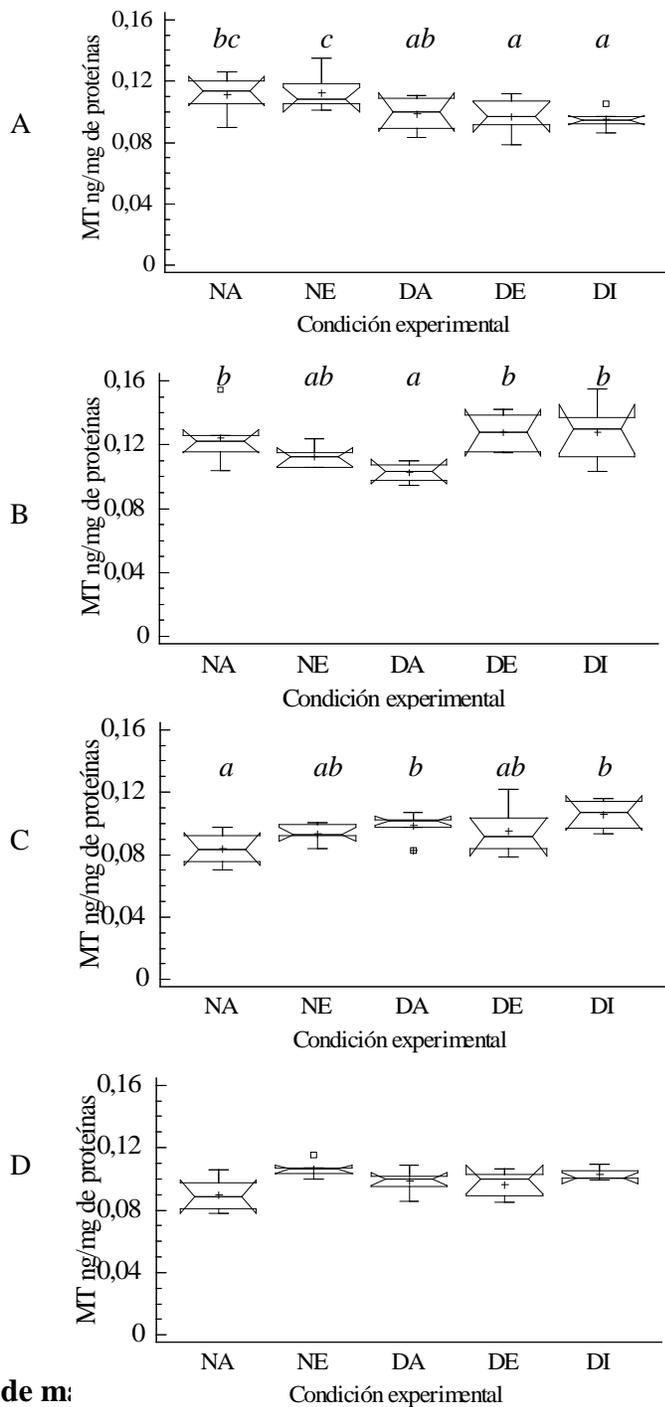


Concentración de GSH (nmol/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *P. niruri*

En la figura 5A (apéndice 5A) se muestra el contenido de MT en el tejido retiniano de los distintos grupos experimentales a los 15 días, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas (KW: 10,21; $p < 0,05$) entre el grupo normal tratado con el extracto ($0,11 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) y los diabéticos, y entre los diabéticos tratados tanto con el extracto ($0,10 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) como con insulina ($0,10 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) con los grupos normales. Sin embargo, a los 30 días del bioensayo se encontró diferencias estadísticamente significativas (KW: 11,43; $p < 0,05$) entre las ratas diabéticas sin tratamiento ($0,10 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) y los grupos diabéticos tratados (DE: $0,13 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas; DI: $0,13 \pm 0,02$ ng/mg de proteínas) y el control ($0,12 \pm 0,02$ ng/mg de proteínas), además se observa en la figura 5B y apéndice 5B que los grupos diabéticos tratados presentaron la concentración de MT un poco más elevada que el grupo normal.

A los 45 días hubo diferencias significativas (KW: 10,86; $p < 0,05$), formándose dos grupos a partir de la prueba *a posteriori* aplicada, y las diferencias estuvieron entre el grupo control ($0,08 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) con los grupos diabético control ($0,10 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) y diabético tratado con insulina siendo este último el que presentó el mayor contenido de MT ($0,11 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) y a los 60 días del experimento no se encontró diferencias estadísticamente significativas (KW: 9,33; $p > 0,05$) (figura 5C y D, apéndice 5C y D). El efecto del extracto acuoso de la planta para estos tiempos no tuvo mayor repercusión sobre la estimulación en la producción de MT.

Figura 5. Concentración de MT (ng/mg de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 10,21, $p < 0,05$; B: 30 días, KW: 11,43, $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 10,86, $p < 0,05$; D: 60 días, KW: 9,33, $p > 0,05$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.



Concentración de m:
acuoso de *P. niruri*

diabéticas tratadas con el extracto

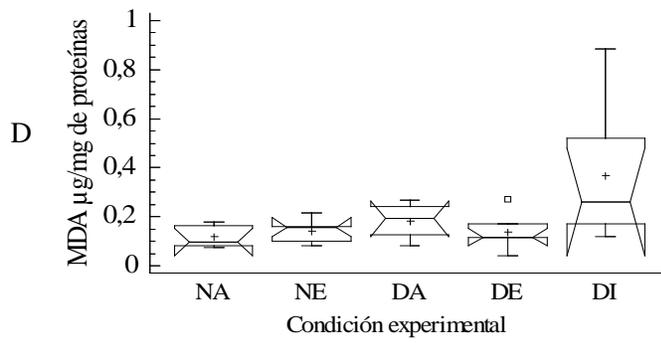
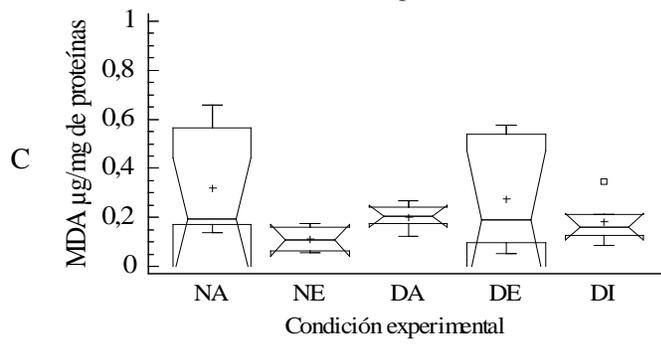
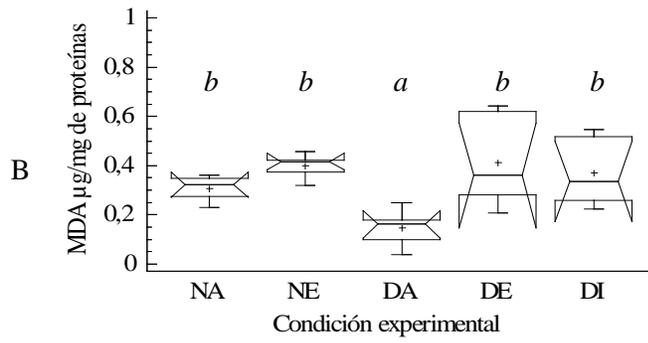
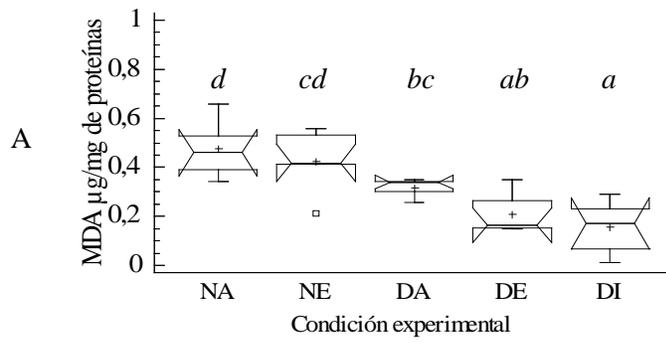
Se puede observar en la figura 6, que solo a los primeros 30 días de la experiencia se encontró diferencias significativas (KW: 18,24; $p < 0,05$) entre las ratas controles ($0,48 \pm 0,12 \mu\text{g}$ de MDA/mg de proteínas) y los grupos de ratas diabéticas (DA: $0,32 \pm 0,04 \mu\text{g}$ de MDA/mg de proteínas; DE: $0,21 \pm 0,08 \mu\text{g}$ de MDA/mg de proteínas y DI: $0,16 \pm 0,11 \mu\text{g}$ de MDA/mg de proteínas) (figura 6A, apéndice 6A) y a los 30 días con un KW: 12,17; $p < 0,05$, existiendo diferencias entre el grupo diabético sin tratamiento ($0,15 \pm 0,08 \mu\text{g}$ de MDA/mg de proteínas) con el resto de los grupos. A pesar de que a partir de los 45 días no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales (figura 6C y D, apéndice 6C y D); hay que resaltar que a los 60 días en el grupo diabético tratado con insulina hubo mayor producción de MDA ($0,37 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas) en el tejido retiniano (figura 6D, apéndice 6D).

Contenido de proteínas en la fracción citosólica y de membrana del tejido retiniano de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *P. niruri*

Los geles electroforéticos a los 60 días de bioensayo mostraron que la banda con peso molecular más bajo de 77 kDa (\downarrow) en la fracción citosólica de los grupos diabéticos se expresó con mayor intensidad que en los grupos normales, siguiendo en orden descendente, el par de bandas seguidas a la anterior pero mayor de 50 kDa (*) también se mostraron con mayor intensidad que las presentes en los grupos de ratas normales. La banda del grupo control marcada con Δ menor a los 50 kDa se observó difusamente, contrario a lo observado en el resto de los grupos (figura 7A).

A nivel de los 34,3 kDa en los grupos tratados con el extracto, tanto normal como diabético la banda superior de este par se presentó poco visible en el grupo normal y en el diabético parcialmente degradada (o); la banda seguida de la anterior y un poco más

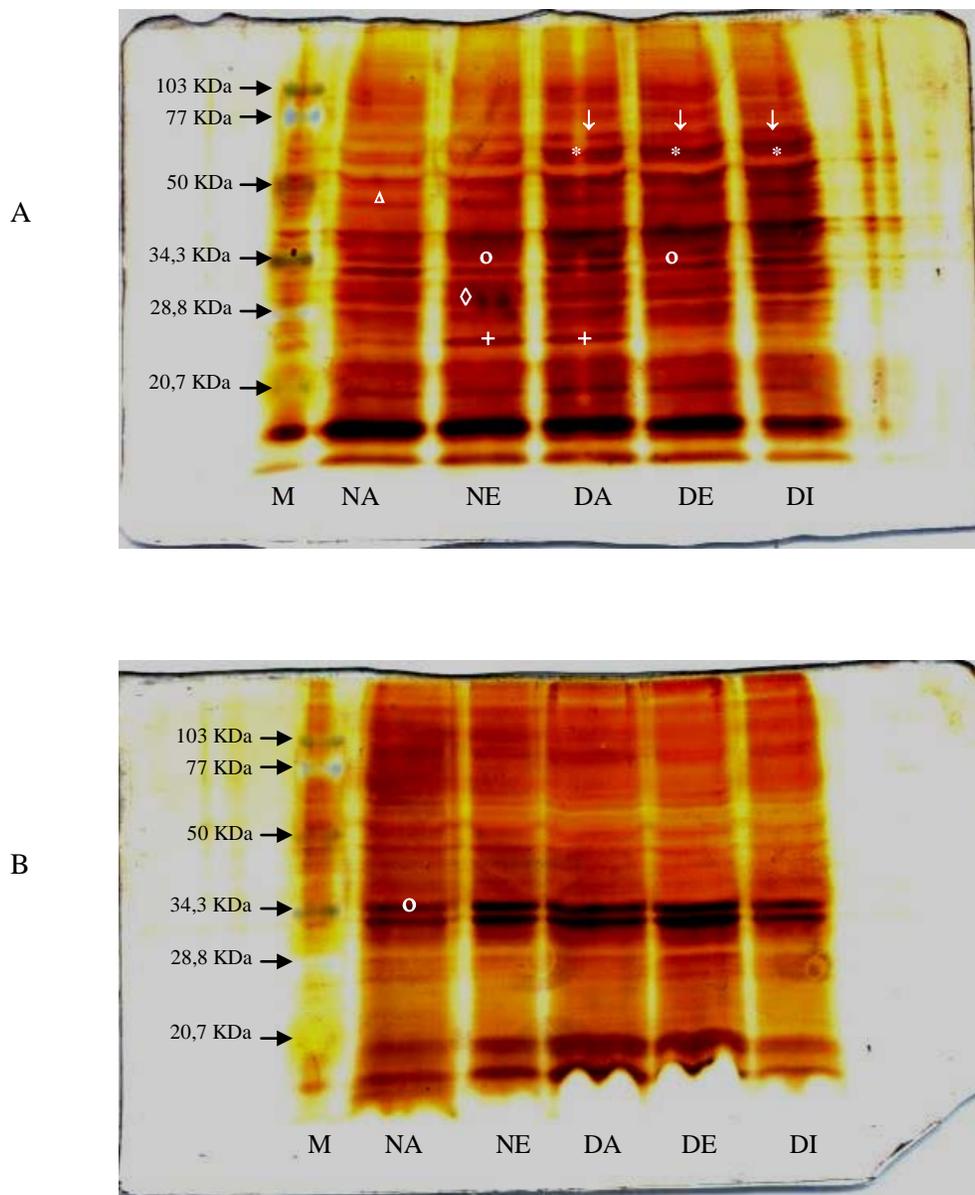
Figura 6. Concentración de MDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas) en retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: A: 15 días, KW: 18,24, $p < 0,05$; B: 30 días, KW: 12,17, $p < 0,05$; C: 45 días, KW: 5,51; $p > 0,05$; D: 60 días, KW: 8,40, $p > 0,05$; KW: análisis de Kruskal-Wallis, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.



pesada de 28,8 kDa del grupo normal tratado con el extracto acuoso de *P. niruri* (◇) se observó muy difusa respecto a la del resto de las condiciones experimentales que se expresaron claramente y por último en los grupos normal tratado con el extracto y en el diabético sin tratamiento entre los 28,8 kDa y 20,7 kDa se expresó intensamente la presencia de una banda (+) que con dificultad se apreció en el resto de los grupos (figura 7A).

En la fracción de membrana del tejido retiniano las bandas proteínicas en general no se revelaron muy claramente aunque a nivel de los 34,3 kDa se observó que el par de bandas correspondientes al grupo control (o) no se reflejaron con tanta intensidad como en el resto de las condiciones experimentales (figura 7B).

Figura 7. Geles SDS-PAGE 15% a los 60 días de experimentación en las retinas de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. A: proteínas citosolicas y B: proteínas de membrana. M: marcador, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina. ↓: banda entre 50-77 KDa, *: par de bandas entre 50-77 KDa, Δ: banda entre 34,3-50 KDa, o: par de bandas de 34,3 KDa, ◊: banda entre 28,8-34,3 KDa y +: banda entre 20,7-28,8 KDa.



DISCUSIÓN

En la presente investigación se evidenciaron variaciones significativas en las enzimas SOD, y CAT, además los niveles de GSH, metalotioninas y malonaldehído fueron afectados en el tejido retiniano existiendo alteración del metabolismo oxidativo como consecuencia de la condición diabética y su tratamiento con el extracto de la planta *P. niruri* e insulina, sugiriendo posiblemente mecanismos metabólicos adaptativos, relacionados con alteraciones del metabolismo oxidativo.

A lo largo de los 60 días del bioensayo se evidenció que las ratas diabéticas sin tratamiento presentaron niveles promedio de 200 mg/dl de glucemia, valores que corresponden a los señalados por American Diabetes Association Expert Committee (1997), (citado por Harris 2000) y por Pari y Latha (2004) como valores clínicos de una condición diabética. No obstante, una ligera disminución ocurrió a los 60 días; todavía muy superior al observado en ratas normales sin tratamiento (figura 1D, apéndice 1D).

Las observaciones anteriormente mencionadas, probablemente estén relacionadas con la reversión de la condición diabética pues se ha demostrado que el aloxan un derivado de la pirimidina, reactivo utilizado para la inducción de biomodelos diabéticos puede no ser lo suficientemente eficiente para causar el daño total de las células β del páncreas, por su inestabilidad química, metabolismo rápido de algunos factores, tales como dieta y edad, que tornan casi imposible una relación clara entre las dosis de aloxan y su concentración efectiva al páncreas, aunque en trabajos de hasta dos semanas de duración se han mantenido los niveles altos de glucosa sanguínea (Marles y Farnsworth, 1995 (citado por Negri, 2005); y Viana *et al.*, 2004).

Por otro lado, las ratas diabéticas tratadas con insulina mostraron un patrón de incremento de los niveles glucémicos desde el inicio del experimento, aún cuando en promedio no pasan de 200 mg/dl (figura 1), lo que plantea que estos organismos pudieron presentar insensibilización a la insulina acarreado alteraciones en el metabolismo de azúcares, lípidos, proteínas e iones a causa de anomalías en la transcripción génica, la regulación de enzimas, el transporte y la transposición proteínica, lo cual incrementa el estrés oxidativo en el organismo (Caro y Stramm, 2000).

La posibilidad de que ocurra la evolución de una diabetes tipo 1 a una de tipo 2, de acuerdo a Harris (2000) la considera entre uno de los grupos atípicos de esta enfermedad, no obstante aún cuando la causa de la diabetes tipo 2 no se conoce, tiene una base genética importante por su patrón familiar frecuente; sin embargo, en este ensayo el método de inducción de la enfermedad por vía intraperitoneal bien podría influenciar en el comportamiento de la enfermedad, ya que por esta vía no necesariamente se dañan en su totalidad las células β -pancreáticas al no entrar el aloxan directamente al torrente sanguíneo y de esta manera con el tiempo se expresa una diabetes de tipo 2.

De acuerdo al incremento significativo observado en los niveles de glucemia en las ratas diabéticas tratadas con insulina a los 60 días de tratamiento se puede asumir que el alto nivel de azúcar posiblemente esté induciendo en la retina el aumento de la SOD para contrarrestar los daños oxidativos causados por la hiperglucemia. Por otro lado, cuando las ratas diabéticas son tratadas con el extracto acuoso de *P. niruri* para este mismo período, se pudo evidenciar una disminución de los niveles de glicemia por dicho extracto, lo cual corresponde con el decrecimiento significativo en la actividad de SOD, sugiriendo el efecto hipoglucémico del extracto acuoso (figura 1D y 2D).

En este mismo orden de ideas, las alteraciones metabólicas causadas por la condición de diabetes se encuentra acompañada de un desbalance en la respuesta antioxidante, la enzima SOD que tiene como función barrer los grupos superóxidos se encuentra afectada principalmente durante los 60 días de tratamiento, particularmente cuando las ratas diabéticas son tratadas con la insulina, donde la actividad de esta enzima se incrementa (figura 2D). Por otro lado el aumento en la actividad de la SOD estuvo acompañada por un incremento de los niveles de GSH durante este mismo período (figura 4D); así mismo en este grupo particular se produce la mayor concentración de MDA al final del bioensayo (figura 6D), demostrando que la posible resistencia a la dosis de insulina suministrada está acarreado una producción extra de ROS que induce la respuesta antioxidante de los organismos.

Se sabe que la enzima SOD actúa como la mayor defensa contra los efectos citotóxicos de los radicales superóxidos y protege efectivamente al tejido retinal contra la oxidación del radical libre de fosfolípidos de membrana (Kowluru *et al.*, 1997). En la actividad de SOD no se observó variación alguna entre los distintos grupos a lo largo del bioensayo, salvo por el incremento de su actividad por los

grupos diabéticos tratados con insulina a los 60 días y con el extracto de *P. niruri* al final del ensayo (figura 2D), atribuyéndole una posible actividad antioxidante del extracto de la planta, en este caso a nivel de las enzimas SOD y CAT, y en la molécula de GSH, comparándose esta cualidad a los resultados obtenidos por Harish y Shivanandappa (2006) al comprobar la actividad antioxidante del extracto de *P. niruri* al incrementar la actividad de las enzimas glutamato-piruvato transaminasa y glutamato oxaloacetato transaminasa; aunque no es posible explicar si el efecto es directo o como consecuencia de su actividad hipoglucémica que impide que los elevados niveles de glucosa causen alteraciones a nivel del tejido retiniano.

Así mismo los organismos diabéticos tratados con el extracto acuoso de la planta superaron la actividad de SOD respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento (figura 2C y D), concordando esto con estudios realizados por Kowluru *et al.* (1999), quienes utilizando una mezcla de antioxidantes como el ácido ascórbico, trolox, β -caroteno entre otros en retina y cortes de cerebro de ratas obtuvieron el incremento de SOD, y Mazunder *et al.* (2005) que trabajaron con el extracto metanólico de *P. niruri* en tejidos como el cerebro, corazón, hígado y riñón, encontraron que todos estos incrementaron la actividad de dicha enzima con los tratamientos aplicados.

El grupo diabético sin tratamiento, en general tuvo un comportamiento normal en la actividad de SOD a lo largo del experimento (figura 2), sugiriendo que la fuente principal de producción del radical superóxido por efecto de la hiperglucemia no está en el citosol, pudiendo estar en la mitocondria; siendo estos resultados semejantes a los obtenidos por Sasvari y Nyakas (2003) al encontrar en sangre de grupos diabéticos, que dicha enzima disminuyó poco los primeros siete días del experimento y que los niveles de SOD se igualaron al de los organismos normales a partir de la décima semana hasta los 8,5 meses que duró el experimento.

El comportamiento de SOD en las ratas diabéticas sin tratamiento, concuerda con los datos obtenidos por otros autores en homogenizados de retinas, los cuales encontraron que la actividad de la enzima disminuye en los organismos enfermos conforme pasa el tiempo, atribuyéndole la disminución de la enzima en organismos diabéticos al exceso de las ROS presentes, producto de la hiperglucemia (Kowluru *et al.*, 1997 y 1999; y Kowluru *et al.*, 2006)

De acuerdo a Brownlee (2005), la mitocondria es el organelo celular donde se produce la mayor cantidad del radical superóxido por efecto de la hiperglucemia que luego es barrido por la isoforma mitocondrial de SOD, lo que produce mayor cantidad de peróxido de hidrógeno; que va a ser barrido por la glutatión peroxidasa en la mitocondria y/o por la CAT en el citosol (Evans *et al.*, 2002 y Mazunder *et al.*, 2005). Por lo tanto, en este trabajo se puede explicar el incremento significativo de la CAT en las ratas diabéticas sin tratamiento a partir de los 45 días, por la declinación parcial o completa de la acción de la glutatión peroxidasa sobre el H₂O₂ (Kowluru *et al.*, 1997), donde la CAT compensa satisfactoriamente esta falta; notándose que dicho comportamiento no ocurre en los diabéticos tratados (figura 3C y D).

A partir de los 60 días se observa que el extracto acuoso de *P. niruri* potenció la actividad de la CAT en el tejido retiniano tanto en los organismos normales como en los diabéticos (figura 3D), relacionándose estos resultados a los datos obtenidos por Kowluru *et al.* (1999), quienes al suministrarle a los organismos una mezcla de antioxidantes (ácido ascórbico, trolox, β-caroteno, entre otros) encontraron que la actividad de la CAT es aumentada y por esta razón le atribuyeron propiedades antioxidantes; contrario a esto Kowluru *et al.* (1997) no encontraron un efecto significativo de tratamientos con antioxidantes (Vitaminas C y E) sobre la CAT en la retina de ratas diabéticas.

El comportamiento casi invariable de la SOD y el incremento de CAT en los organismos diabéticos sin tratamiento puede ser atribuido a la inducción bien conocida de catalasa y reducción de la actividad de SOD por estrés oxidativo y principalmente por el H₂O₂ (Sözmen *et al.*, 2001).

El GSH es el mejor antioxidante endógeno, el cual contrarresta los daños mediados por los radicales libres. Es bien conocido que el GSH está involucrado en la protección de la estructura y función celular normal, manteniendo la homeostasis redox, eliminando los radicales libres y participando en las reacciones de destoxificación, así como protege a los ácidos grasos poliinsaturados de los segmentos externos de los bastones contra la peroxidación lipídica (Keys y Zimmerman, 1999 (citados por Rojas *et al.*, 2004) y Mazunder *et al.*, 2005).

La disminución significativa de GSH a los 60 días del bioensayo en las ratas diabéticas sin tratamiento comparado con el grupo control (figura 4D), sugiere que la función de este antioxidante

endógeno comienza a decaer para este tiempo por el constante aumento del estrés oxidativo debido a la hiperglucemia presente en el organismo (figura 4D) (Evans *et al.*, 2002; Pari y Latha, 2004; Mazunder *et al.*, 2005). Esta disminución altamente significativa revela que la cadena transportadora de electrones pudiera estar disminuida y es en este momento donde se activa la ruta del polyol, metabolizándose por la aldosa reductasa el exceso de glucosa ocasionando la inhibición de la producción de GSH por la competencia del cofactor NADPH, que ocurre en tejidos sensibles como la retina (Taylor y Agius, 1988; Dagher *et al.*, 2004; Brownlee, 2005).

Aunque otros estudios han demostrado que en organismos diabéticos la edad también es un factor importante en el nivel del GSH, esto también podría estar influenciando en la disminución de su concentración al final del ensayo (figura 4D) (Cai *et al.*, 2000).

Shimizu *et al.* (1989) (citado por Taylor, 2003), destacaron el efecto inhibitorio en la aldosa reductasa por el extracto de la planta *P. niruri*, sabiendo esto, se puede decir que en este estudio el extracto acuoso de la planta para el último muestreo inhibió la acción de la aldosa reductasa en el grupo de ratas diabéticas reflejándose en el incremento del GSH (figura 4D).

Se conoce por estudios de otros autores que la MT está presente en casi todos los tejidos del organismo, aún en el aparato ocular, cumpliendo funciones antioxidantes, barriendo radicales hidroxilos y enlazando metales (Viarengo *et al.*, 1997; Hidalgo *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002). Hasta ahora la mayoría de los estudios que se han realizado de metalotioninas en la retina han sido por pruebas inmunohistológicas en las que se ha podido identificar que estas proteínas se encuentran abundantemente en la capa de células ganglionares y más débilmente por otras células en el remanente de la retina neural (Lu *et al.*, 2002).

Los resultados demuestran que las MT disminuyen significativamente en ratas diabéticas durante los primeros 30 días de ensayo, sin embargo, cuando son tratadas con el extracto y la insulina esta disminución fue revertida para este mismo período a valores similares al de las ratas normales (figura 5A y B). Posiblemente en los primeros 30 días de la condición diabética la concentración de MT pudiera estar inhibida como consecuencia de una disminución de la peroxidación lipídica, que es sinónimo de menor concentración de especies reactivas que dañen los lípidos, sin embargo, la enzima CAT

incrementó su actividad durante este periodo compensando posiblemente el H₂O₂ formado por la condición diabética (figura 3A y B; figura 5A y B).

A partir de los 45 días parece haber un efecto compensatorio que permitió el incremento de esta biomolécula en diabéticos sin tratamiento, alcanzando un valor similar a las ratas diabéticas tratadas.

En la figura 5C y D se observó que la MT cumplió un papel protector en los grupos diabéticos, sobre todo en el tratado con insulina a los 45 y 60 días (figura 5C y D), como mecanismo compensatorio a la declinación de CAT e incremento de MDA; atribuyéndole a esto que los radicales libres producidos por la resistencia a la insulina para este tiempo comienzan a alterar los parámetros anteriores.

El grupo diabético tratado con insulina evidencia la asociación del GSH con la MT (figura 4 y 5) al observarse a lo largo del bioensayo que la relación entre estas dos moléculas es directamente proporcional, ya que se ha demostrado anteriormente que el disulfido de glutatión libera zinc de la MT y que esta coparticipa en los eventos sinápticos relacionados con zinc (Maret, 1994; Ebadi *et al.*, 1995). Al liberarse el zinc de la MT, esta está en la capacidad de expresarse y barrer los radicales hidroxilos cumpliendo así su función antioxidante y protectora ante condiciones de estrés (Viarengo *et al.*, 1997; Hidalgo *et al.*, 2002).

En otro orden de ideas, aún cuando Miranda *et al.* (2004) encontraron en su trabajo un incremento de la lipoperoxidación a los 7 días en retinas de ratas diabéticas y lograron controlarla con tratamientos de antioxidantes a los 7 días; y Harish y Shivanandappa (2006) lograron disminuir el MDA a los 14 días con extractos de *P. niruri* en hígado de ratas diabéticas, sin embargo, en este bioensayo a los 15 días se observó (figura 7A) que los organismos diabéticos tenían menor contenido de MDA, esto estuvo asociado a un incremento significativo de la CAT, al barrer el exceso de H₂O₂ del citosol producto posiblemente del fallo de la enzima glutatión peroxidasa en la mitocondria (Kowluru *et al.*, 1997), lo cual pone en manifiesto que probablemente esta enzima juega un papel crucial para barrer los H₂O₂ y no permite que este dañe la retina.

Este comportamiento metabólico podría explicar la disminución de MT durante los primeros 30 días, ya que posiblemente la presencia de radicales OH[•] estén siendo controlados esencialmente por el

desdoblamiento de H_2O_2 por la CAT; por otro lado, tanto el extracto acuoso de la planta como la insulina disminuyeron aún más la producción de MDA, aunque para los 30 días en estos mismos grupos la concentración de MDA se vio incrementada asemejándose a los grupos normales, mientras que el grupo diabético sin tratamiento mantuvo la menor producción de MDA (figura 6A y B).

La lipoperoxidación medida por la producción de MDA en el tejido retiniano no se vio afectada a partir de los 45 días de experimentación (figura 6C y D), datos que no concuerdan con los obtenidos por otros autores en hígado y cerebro, donde la concentración de MDA incrementó en los organismos diabéticos encontrándose diferencias significativas con los organismos normales (Pari y Latha, 2004; Mazunder *et al.*, 2005; Harish y Shivanandappa, 2006). De este comportamiento casi invariable se puede decir que a partir de este momento los organismos diabéticos adoptan un mecanismo adaptativo o de equilibrio, compensando de esta manera los altos niveles glucémicos, y que los primeros días de la inducción del estado diabético son los más importantes, porque es en ese preciso momento en el cual el organismo debe buscar la respuesta adecuada ante el repentino aumento del estrés oxidativo.

Las evaluaciones en el contenido de proteínas de la fracción citosólica a los 60 días realizadas demuestran ciertas alteraciones como son los casos de bandas entre 50-77 kDa, las condiciones diabéticas expresaron con mayor intensidad las bandas a este nivel, posiblemente se deba al incremento del estrés oxidativo en los organismos como producto de la hiperglucemia; sin embargo, el extracto acuoso en los grupos tratados con el mismo, causó la falta total o parcial de la expresión de la banda superior del par con 34,3 kDa y en el grupo normal al que se le suministró el extracto también se pudo observar que la banda proteica entre 28,8-34,3 kDa no se expresó claramente y a nivel de 20,7-28,8 kDa este grupo reflejó con la misma intensidad una banda expresada en el grupo diabético sin tratamiento, lo que sugiere que el consumo del extracto acuoso de *P. niruri* por parte de organismos normales causa intracelularmente posibles efectos adversos (figura 7A).

Sin embargo, en el contenido de proteínas de la fracción de membrana a los 60 días del ensayo no se observaron mayores diferencias entre las condiciones experimentales (figura 7B).

No obstante, dichas alteraciones solo sugieren que pudiera haber una alteración en algunas proteínas citoplasmáticas que podrían estar relacionadas con enzimas, factores proteicos u otras. Sin

embargo estos resultados permiten solo decir que existen posibles cambios o alteraciones y no son concluyentes para diagnosticar que los organismos diabéticos presentaban o no retinopatía y esto debe ser evaluado con más detalle en futuras investigaciones como es el estudio histológico; sin dejar a un lado los parámetros antioxidantes que si dejaron en claro, que en los grupos diabéticos controles ocurrió una alteración del metabolismo oxidativo y que de una manera u otra fue contrarrestada tanto con el extracto de *P. niruri* como con la insulina.

Similar a lo anterior, Tezel *et al.* (2005) encontraron diferencias en el contenido de proteínas por la hipertensión de ratas con glaucoma empleando geles 2D coloreados con azul Coomassie después de normalizar la reacción anti-DNP, a las 12 semanas de bioensayo.

Se podría pensar que el extracto acuoso de la planta *P. niruri* incrementa el estrés oxidativo, así como la insulina que al presentarse la posible resistencia a la misma a partir de los 45 días de tratamiento esta tiende a alterar el metabolismo, incrementando las ROS y permitiendo la estimulación en la síntesis de las enzimas y moléculas antioxidantes, pero esta idea se descartó al observar que la producción de MDA en los organismos diabéticos tratados con dicho extracto se mantiene similar a los organismos normales; presentando estos resultados analogía con los obtenidos por Harish y Shivanandappa (2006) que extractos de esta misma planta no indujeron lipoperoxidación en el hígado de ratas.

En este trabajo de acuerdo a los parámetros estudiados, se puede decir que el mecanismo de acción del extracto acuoso de la planta *P. niruri* en primera instancia es hipoglucémico ya que a este le han reportado componentes como alcaloides, flavonoides, entre otros que tienen dicho efecto (Mazunder *et al.*, 2005; y Negri, 2005), pero la acción antioxidante en este caso no se le puede atribuir al extracto, porque como ya se dijo anteriormente a partir de los 30 días de tratamiento no hay diferencias significativas en el contenido de MDA entre el grupo diabético control y los diabéticos tratados, aunque otros autores le han atribuido efecto antioxidante pero estos obtienen las diferencias en el MDA antes de los 14 días de experimentación (Miranda *et al.*, 2004; Mazunder *et al.*, 2005; Harish y Shivanandappa, 2006).

Finalmente, como los niveles de estrés oxidativo pueden variar de tiempo en tiempo, bien sea en organismos sanos o enfermos, los organismos son capaces de adaptarse a esas fluctuaciones, con la

inducción de síntesis de enzimas antioxidantes y enzimas barredoras/reparadoras de daño (Pérez, 2000), como es el caso del comportamiento de los niveles de la MT y de la enzima SOD y CAT que tienden a aumentar a partir de los 45 días de tratamiento, independientemente de la condición experimental.

CONCLUSIONES

En los organismos diabéticos sin tratamiento, los niveles glucémicos fueron los más elevados durante todo el experimento ocasionando el incremento de la actividad de la enzima CAT y el fallo en la función de GSH.

El extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* ejerció efecto hipoglucémico en el grupo diabético, estimulando de esta manera la actividad de las enzimas CAT y SOD así como la concentración de GSH al final del experimento.

Sin embargo, en los organismos normales, el extracto de la planta ocasionó la disminución en la actividad de la enzima SOD, la concentración de GSH y aumentó la actividad de la enzima CAT, reflejándose a su vez, en la alteración de las proteínas de la fracción citosólica de la retina.

Los organismos diabéticos tratados con insulina a partir de los 45 días incrementaron los niveles glucémicos, de la enzima SOD, así como, la concentración de GSH, MT y del MDA.

La condición diabética afecta la intensidad de expresión de las proteínas tanto en la fracción citosólica como de membrana del tejido retiniano

RECOMENDACIONES

Con motivo de aclarar las dudas que deja el presente trabajo, se recomienda que a futuro se tome en consideración lo siguiente:

- Establecer el mismo diseño experimental pero comenzar el período de muestreo a partir de las 48 horas de la inducción de la diabetes, con motivo de elucidar el comportamiento de los parámetros antioxidantes al inicio de la enfermedad.
- Manteniendo el diseño experimental y extender el ensayo por más de 3 meses con el objeto de dar tiempo que los daños en el tejido retiniano sean tangibles, tanto funcional como estructuralmente.
- Por medio de análisis, comprobar si ocurre daño total de las células β del páncreas durante la inducción con la dosis de aloxan empleada.
- Realizar un seguimiento a lo largo de la experiencia de los niveles de insulina de los organismos bajo las distintas condiciones experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- Beutler, E.; Duron, O. y Mikus, B. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61: 882-888.
- Berkow, R.; Bondy, P.; Feinstein, A.; Fishman, A.; Hoekelman, R.; Ormsby, J.; Petersdorf, R.; Rossi, G.; Schreiner, G. y Talbott, J. (eds). 1986. *El Manual de Merck de diagnóstico y terapéutica*. Cuarta Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México.
- Bollag, D. y Edelstein, S. 2000. *Protein Methods*. Wiley-Liss Editorial, New York.
- Brownlee, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes*, 54: 1616-1625.
- Budak, Y.; Demirci, H.; Akdogan, M. y Yavuz, D. 2004. Erythrocyte membrane anionic charge in type 2 diabetic patients with retinopathy. *BMC Ophthalmology*, 4: 14-19.
- Cai, J.; Nelso, K.; Wu, M.; Sternberg, P. y Jones, D. 2000. Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19: 205-221.
- Caro, J. y Stramm, L. 2000. Defectos bioquímicos de la acción de la insulina en el ser humano Capítulo 62. En: *Diabetes Mellitus texto básico y clínico*. LeRoith, D.; Taylor, S. y Olefsky, J. (eds). Segunda edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., Madrid-España. Pags. 765-779.
- Dagher, Z.; Seek, Y.; Asnaghi, V. Hoehn, T.; Gerhardinger, C. y Lorenzi, M. 2004. Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes*, 53: 2404-2411.
- Ebadi, M.; Iversen, P.; Hao, R.; Cerutis, D.; Rojas, P.; Happe, H.; Murrin, L. y Pfeiffer, R. 1995. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochemistry International*, 27: 1-22.
- Elsner, M.; Gurgul-Convey, E. y Lenzen, S. 2006. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 825-834.
- Evans, J.; Goldfine, I.; Maddux, B. y Grodsky, G. 2002. Oxidative stress and stress-activated signalling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 23: 599-622.
- Halim, M. 2002. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of *Curcumin* from *Curcuma longa*, Linn, and partially purified product from *Abroma augusta*, Linn. in streptozotocin induced diabetes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 17: 33-43.

- Halim, M. 2002. Reversal of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using traditional Indian anti-diabetic plant, *Azadirachta indica* (L.). *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 17: 115-123.
- Halim, M. 2003. Effect of *Coccinia indica* (L.) and *Abroma augusta* (L.) on glycemia, lipid profile and on indicators of end organ damage in streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 18: 54-63.
- Harris, M. 2000. Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico Capítulo 32. En: *Diabetes Mellitus texto básico y clínico*. LeRoith, D.; Taylor, S. y Olefsky, J. (eds). Segunda edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., Madrid-España. Pags. 406-417.
- Harish, R. y Shivanandappa, T. 2006. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*, 95: 180-185.
- Hidalgo, J. 2004. Respuesta del sistema nervioso central a lesiones traumáticas: papel de las proteínas antioxidantes metalotioneínas. *Ciencia al Día Internacional*, 5: 1-12.
- Hidalgo, J.; Penkowa, M.; Giralt, M.; Carrasco, J. y Molinero, A. 2002. Metallothionein expression and oxidative stress in the brain. *Methods in Enzymology*, 348: 238-249.
- Hnatyszyn, O.; Miño, J.; Ferraro, G. y Acevedo, C. 2002. The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin-induced diabetic mice. *Phytomedicine*, 9: 556-559.
- Jain, S. 2006. Superoxide dismutase overexpression and cellular oxidative damage in diabetes a commentary on “overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress”. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1187-1190.
- Kowluru, R. 2003. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*, 52: 818-823.
- Kowluru, R.; Jirousek, M.; Stramm, L.; Farid, N.; Engerman, R. y Kern, T. 1998. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. relationship between protein kinase C and ATPases. *Diabetes*, 47: 464-469.
- Kowluru, R.; Engerman, R. y Kern, T. 1999. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. VI. Comparison of retinal and cerebral cortex metabolism, end effects of antioxidant therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 371-378.
- Kowluru, R.; Kern, T. y Engerman, R. 1997. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radical Biology & Medicine*, 22: 587-592.
- Kowluru, R.; Kowluru, V.; Xiong, Y. y Ho, Y. 2006. Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1191-1196.

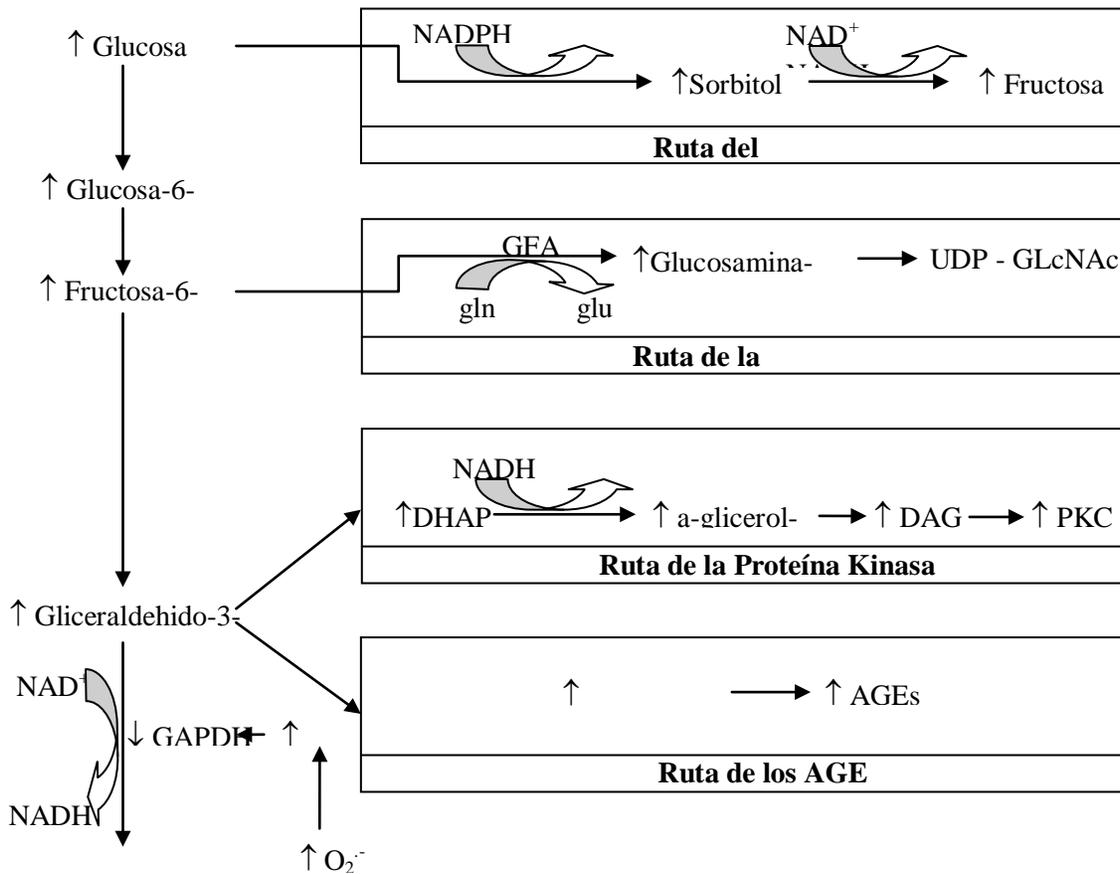
- Lacorn, M.; Lahrssen, A.; Rotzoll, N.; Simat, T.; y Steinhart, H. 2001. Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 140-145.
- Livingstone, D.; García-Martínez, P.; Michel, X.; Narbonne, J.; O'Hara, S.; Ribera, D. y Winston, G. 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytillus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology*, 4: 415-424.
- Lu, H.; Hunt, D.; Ganti, R.; Davis, A.; Dutt, K.; Alam, J. y Hunt, R. 2002. Metallothionein protects retinal pigment epithelial cells against apoptosis and oxidative stress. *Experimental Eye Research*, 74: 83-92.
- Maret, W. 1994. Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 237-241.
- Mathews, C. y Van, K. 2000. *Bioquímica*. Segunda Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U., Madrid, España.
- Matsubara, A.; Tamai, K.; Matsuda, Y.; Niwa, Y.; Morita, A.; Tomida, K.; Armstrong, D. y Ogura, Y. 2005. Protective effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase on leukocyte dynamics in rat retinal microcirculation under lipid hydroperoxide-induced oxidative stress. *Experimental Eye Research*, 81: 193-199.
- Mazunder, U.; Gupta, M. y Rajeshwar, Y. 2005. Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats. *European Bulletin of Drug Research*, 13: 15-23.
- Miño, J.; Acevedo, C.; Moscatelli, V.; Ferraro, G. y Hnatyszyn, O. 2002. Antinociceptive effect of the aqueous extract of *Balbisia calycina*. *Journal of ethnopharmacology*, 79: 179-182.
- Miranda, M.; Muriach, M.; Johnsen, S.; Bosch-Morell, F.; Araiz, J.; Romá, J. y Romero, F. 2004. Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental: tratamiento con antioxidantes. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología*, 79: 289-294.
- Negri, G. 2005. Diabetes melito: plantas e principios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41: 121-142.
- Pari, L. y Latha, M. 2004. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 4: 16-23.
- Pérez, L. 2000. Estrés oxidativo: la paradoja del oxígeno. *Revista Cubana Endocrinológica*, 11: 139-142.

- Rocca, F. y Plá, J. 1963. Historia de la diabetes Capítulo I. En: *Diabetes Mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes*. Rocca, F. y Plá, J. (eds). Edita el Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay. Págs. 11-12.
- Rodriguez, R. y Massera, M. 1963. Complicaciones oculares Capítulo XV. En: *Diabetes Mellitus: bases fisiológicas y fisiopatológicas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la diabetes*. Rocca, F. y Plá, J. (eds). Edita el Departamento de Publicaciones del Sindicato Médico del Uruguay. Uruguay. Págs. 225-243.
- Rojas, L.; McNeil, R. y Cabana, T. 1997. Diurnal and nocturnal visual function in two tactile foraging waterbirds: the american white ibis and the black skimmer. *The Condor*, 99: 191-200.
- Rojas, L.; Suárez, S.; Lemus, M.; Benítez, K.; Ramirez, Y.; Mitchell, M. y Boada-Sucre, A. 2004. Estrés oxidativo como posible causante de retinopatía en ratas en desarrollo sometidas a hiperoxia. *Interciencia*, 29: 556-561.
- Ruíz, B. 1990. "Capítulo XII, Retina Médica". "Esteve". http://www.esteve.es/EsteveArchivos/1_8/Ar_1_8_44_APR_7.pdf (01/11/2005).
- Sasvári, M. y Nyakas, C. 2003. Time dependent changes in oxidative metabolism during chronic diabetes in rats. *Acta Biologica Szegediensis*, 47: 153-158.
- Solomon, E.; Berg, L.; Martin, D. y Villet, C. 1998. *Biología de Villet*. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México.
- Sözmen, E.; Sözmen, B.; Delen, Y. y Onat, T. 2001. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control. *Archives of Medical Research*, 32: 283-287.
- Taylor, L. 2003. *Herbal Secrets of the Rainforest*. Segunda Edición. Sage Press, Inc. Brazil.
- Taylor, R. y Agius, L. 1988. The biochemistry of diabetes. *Biochemical Journal*, 250: 625-640.
- Tezel, G.; Yang, X. y Cai, J. 2005. Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46: 3177-3187.
- Venereo, J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*, 31: 126-33.
- Viana, G.; Medeiros, A.; Lacerda, A.; Leal, L.; Vale, T. y Matos, F. 2004. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology*, 4: 9-15.

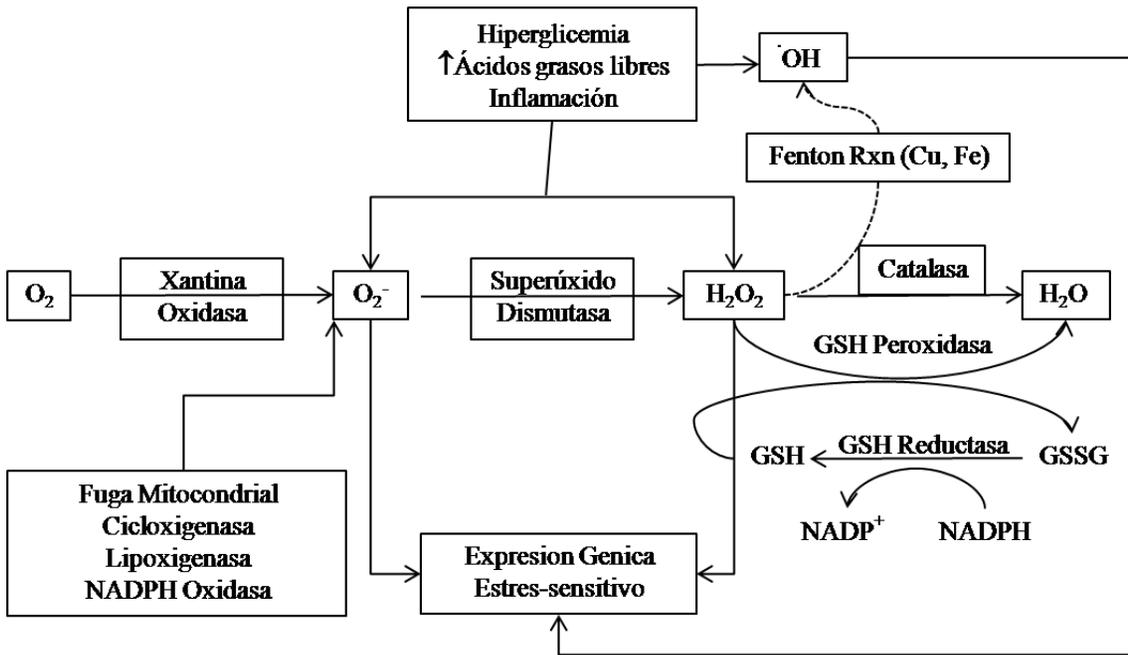
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F. y Fabbri, R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antartic molluscs. *Marine Enviromental Research*, 44: 69-84.
- Viswanath, K. y Murray, D. 2003. Diabetic Retinopathy: Clinical Findings and Management. *Community Eye Health*, 16: 21-24.
- Zangger, K.; Shen, G.; Oz, G.; Otvos, J. y Armitage, I. 2001. Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the α -domain. *Biochemical Journal*, 359: 353-360.

ANEXOS

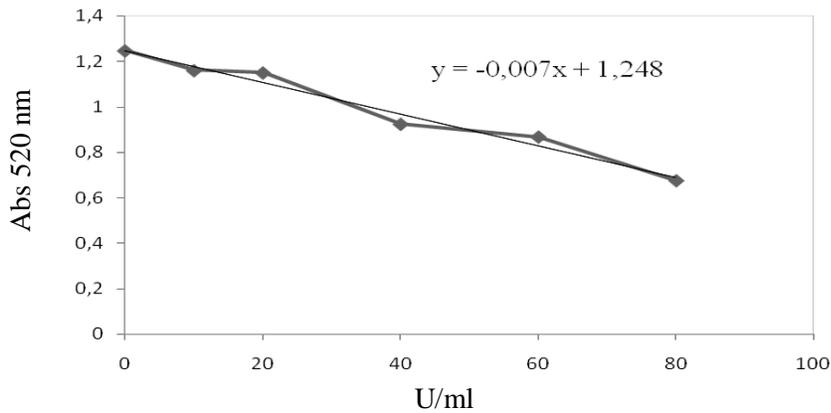
Anexo 1: Producción mitocondrial de superóxido activa las cuatro vías principales de daño hiperglucémico por inhibición de GAPDH, extraído de Brownlee, 2005.



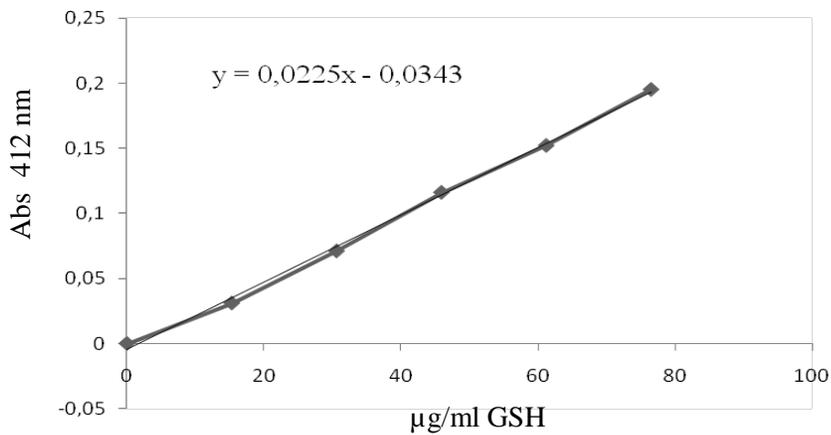
Anexo 2. Estimulación exógena y endógena que permite la generación de las ROS y activación de la expresión génica estrés-sensitivo, extraído de Evans *et al.*, 2002.



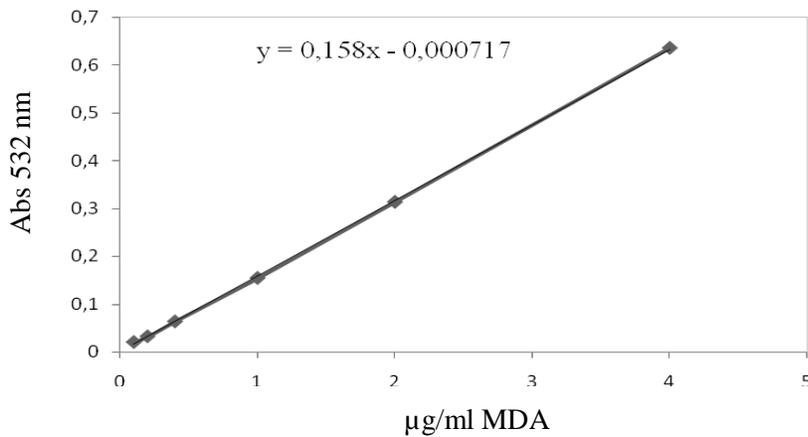
Anexo 3. Curva patrón de la enzima CAT, expresada en U/ml a una absorbancia de 520 nm.



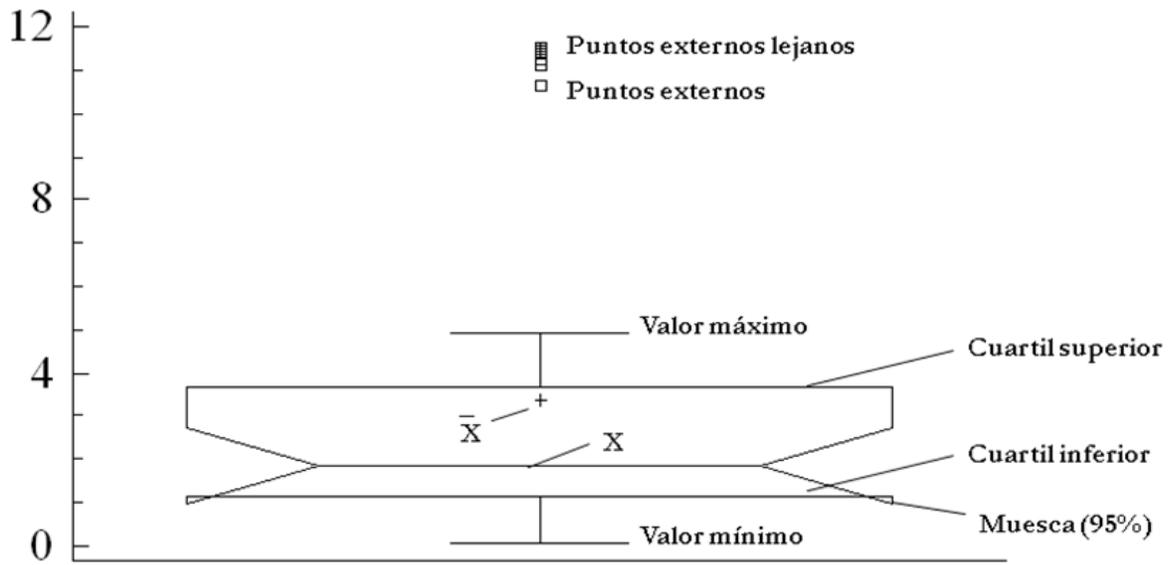
Anexo 4. Curva patrón de GSH de 0,1 mmol/l, expresada en $\mu\text{g/ml}$ de GSH a una absorbancia de 412 nm.



Anexo 5. Curva patrón de MDA de 20 mmol/l, expresada en $\mu\text{g/ml}$ de MDA a una absorbancia de 532 nm.



Anexo 6: Ejemplo de las gráficas de caja y bigote.



APÉNDICES

Apéndice 1. Resumen estadístico de los niveles de glucemia en ratas diabéticas sometidas al extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: X: media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste múltiple de rango, KW: análisis de Kruskal-Wallis, A: 15 días, B: 30 días, C: 45 días, D: 60 días, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

A

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	119,00	120,00	7,56	107,00	129,00	18,26	**	a
NE	6	126,00	128,50	13,58	102,00	141,00			ab
DI	6	135,33	128,50	23,22	115,00	176,00			ab
DE	6	139,17	138,50	11,23	128,00	156,00			b
DA	6	184,17	184,00	7,83	174,00	196,00			c
Total	30	140,83	129,00	26,52	102,00	196,00			

p-valor = 0,0011

B

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	114,17	114,50	7,78	105,00	125,00	21,16	***	a
DI	6	145,33	135,00	49,02	89,00	236,00			ab
NE	6	142,00	139,50	10,59	129,00	156,00			b
DE	6	168,67	165,00	32,35	126,00	223,00			b
DA	6	257,83	261,50	39,18	201,00	301,00			c
Total	30	165,60	146,50	58,30	89,00	301,00			

p-valor = 0,0002

C

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	133,00	122,00	32,40	94,00	177,00	21,44	***	a
NE	6	125,18	126,00	18,32	102,00	155,00			a
DE	6	151,33	152,50	19,87	129,00	175,00			ab
DI	6	173,50	176,50	10,21	156,00	185,00			bc
DA	6	210,00	195,00	27,80	786,00	255,00			c
Total	30	158,60	165,50	37,80	94,00	255,00			

p-valor = 0,0002

D

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NE	6	119,00	117,50	6,60	112,00	131,00	19,22	***	a
NA	6	123,00	120,00	15,45	102,00	145,00			a
DE	6	132,83	142,50	21,01	102,00	152,00			a
DA	6	173,00	151,50	40,88	139,00	232,00			b
DI	6	175,17	168,00	19,60	159,00	212,00			b
Total	30	144,60	142,00	33,17	102,00	232,00			

p-valor = 0,0007

Apéndice 2. Resumen estadístico de la actividad de SOD en retinas de ratas diabéticas sometidas al extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: X: media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste múltiple de rango, KW: análisis de Kruskal-Wallis, A: 15 días, B: 30 días, C: 45 días,

D: 60 días, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

A

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DI	5	0,16	0,05	0,22	0,04	0,55	8,33	NS	
DA	6	0,19	0,14	0,19	0,04	0,56			
NE	5	0,33	0,33	0,09	0,21	0,44			
DE	6	0,49	0,57	0,17	0,15	0,59			
NA	4	0,52	0,48	0,53	0,04	1,09			
Total	26	0,33	0,24	0,28	0,04	1,09			

p-valor = 0,080

B

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	0,41	0,33	0,31	0,14	0,88	10,39	*	<i>a</i>
DE	6	1,34	1,44	0,60	0,46	2,09			<i>ab</i>
DA	6	1,71	1,15	1,54	0,31	3,86			<i>ab</i>
NE	6	2,49	2,84	1,82	0,20	4,65			<i>b</i>
DI	6	2,66	2,75	1,63	0,88	4,39			<i>b</i>
Total	30	1,72	1,13	1,49	0,14	4,65			

p-valor = 0,034

C

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DE	5	4,40	4,09	0,88	3,64	5,77	6,78	NS	
NA	4	4,40	4,17	0,95	3,54	5,73			
NE	6	4,65	4,74	0,63	3,89	5,61			
DA	5	4,78	4,64	0,38	4,33	5,23			
DI	6	5,81	5,34	1,12	4,62	7,58			
Total	26	4,86	4,73	0,95	3,54	7,58			

p-valor = 0,15

D

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NE	6	3,78	3,81	0,19	3,45	4,00	16,53	**	<i>a</i>
NA	6	4,44	4,62	0,58	3,48	5,01			<i>ab</i>
DA	5	4,78	4,64	0,38	4,33	5,24			<i>ab</i>
DE	6	4,92	5,11	0,85	3,35	5,65			<i>b</i>
DI	6	5,72	5,55	0,69	4,88	6,77			<i>c</i>
Total	29	4,73	4,70	0,85	3,35	6,77			

p-valor = 0,002

Apéndice 3. Resumen estadístico de la actividad de CAT en retinas de ratas diabéticas sometidas al extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: X: media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste múltiple de rango, KW: análisis de Kruskal-Wallis, A: 15 días, B: 30 días, C: 45 días, D: 60 días, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

A

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DE	6	0,39	0,44	0,22	0,02	0,62	6,06	NS	
DI	6	0,41	0,12	0,53	0,02	1,18			
NE	6	0,57	0,49	0,19	0,40	0,88			
NA	6	0,68	0,75	0,44	0,02	1,30			
DA	6	1,14	0,98	0,74	0,20	2,01			
Total	30	0,64	0,53	0,52	0,02	2,01			

p-valor = 0,195

B

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NE	5	0,28	0,06	0,33	0,02	0,71	9,72	*	a
DE	4	0,58	0,53	0,13	0,49	0,76			a
NA	6	0,99	0,70	0,66	0,57	2,30			a
DA	6	1,51	1,68	1,33	0,02	3,32			ab
DI	6	2,93	3,02	2,10	0,54	5,01			b
Total	27	1,34	0,71	1,49	0,02	5,01			

p-valor = 0,045

C

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DE	5	0,32	0,02	0,41	0,02	0,84	18,85	***	a
DI	5	0,46	0,53	0,36	0,09	0,94			a
NE	6	0,93	1,04	0,47	0,08	1,33			ab
NA	6	1,52	1,46	0,81	0,32	2,68			b
DA	5	11,15	11,14	0,39	10,53	11,50			c
Total	27	2,76	0,99	4,13	0,02	11,50			

p-valor = 0,0008

D

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DI	5	0,79	0,45	0,87	0,04	2,19	19,86	***	a
NA	6	0,89	0,84	0,46	0,45	1,41			a
DE	6	2,32	2,12	0,70	1,81	3,67			b
NE	6	2,50	1,88	1,47	1,15	4,89			b
DA	5	11,21	11,29	0,35	10,63	11,52			c
Total	28	3,36	1,82	3,88	0,04	11,52			

p-valor = 0,0005

Apéndice 4. Resumen estadístico de la concentración de GSH en retinas de ratas diabéticas sometidas al extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: X: media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste múltiple de rango, KW: análisis de Kruskal-Wallis, A: 15 días, B: 30 días, C: 45 días, D: 60 días, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

A

Condic.	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif.	CMR
---------	---	-----------	---	------	--------	--------	----	------	-----

Experim								Sign.
NA	6	0,15	0,18	0,07	0,03	0,22	9,00	NS
DI	6	0,20	0,10	0,22	0,03	0,60		
NE	6	0,24	0,20	0,08	0,17	0,38		
DE	6	0,29	0,26	0,14	0,12	0,52		
DA	6	0,32	0,31	0,06	0,25	0,43		
Total	30	0,24	0,21	0,13	0,03	0,59		

p-valor = 0,06

B

Condic.	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif.	CMR
Experim								Sign.	
NA	6	0,03	0,03	0,00	0,02	0,04	14,13	**	a
NE	6	0,10	0,08	0,08	0,01	0,21			a
DE	6	0,11	0,11	0,07	0,03	0,21			a
DA	6	0,19	0,07	0,22	0,02	0,48			a
DI	6	0,40	0,53	0,23	0,08	0,58			b
Total	30	0,16	0,08	0,19	0,01	0,58			

p-valor = 0,007

C

Condic.	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif.	CMR
Experim								Sign.	
NA	6	0,58	0,70	0,41	0,08	1,13	9,86	*	a
NE	6	0,67	0,62	0,12	0,57	0,90			ab
DA	5	0,67	0,68	0,07	0,60	0,76			ab
DE	5	0,70	0,69	0,05	0,66	0,78			ab
DI	6	0,87	0,86	0,06	0,79	0,96			b
Total	28	1,00	1,00	0,21	0,08	1,13			

p-valor = 0,04

D

Condic.	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif.	CMR
Experim								Sign.	
NE	6	0,57	0,57	0,02	0,52	0,58	20,82	***	a
DA	5	0,67	0,69	0,07	0,60	0,76			a
DE	6	0,85	0,77	0,22	0,66	1,23			b
NA	6	0,88	0,85	0,10	0,76	1,04			b
DI	6	0,98	0,99	0,07	0,91	1,06			b
Total	29	0,79	0,76	0,19	0,52	1,23			

p-valor = 0,0003

Apéndice 5. Resumen estadístico de la concentración de MT en retinas de ratas diabéticas sometidas al extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: X: media, \bar{X} : mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste múltiple de rango, KW: análisis de Kruskal-Wallis, A: 15 días, B: 30 días, C: 45 días, D: 60 días, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

A

Condic.	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif.	CMR
Experim								Sign.	
DI	6	0,10	0,10	0,01	0,09	0,11	10,21	*	a
DE	6	0,10	0,10	0,01	0,08	0,11			a

DA	6	0,10	0,10	0,01	0,08	0,11			<i>ab</i>
NA	6	0,11	0,11	0,01	0,09	0,13			<i>bc</i>
NE	6	0,11	0,11	0,01	0,10	0,14			<i>c</i>
Total	30	0,10	0,10	0,01	0,08	0,14			

p-valor = 0,04

B

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DA	4	0,10	0,10	0,01	0,09	0,11	11,43	*	<i>a</i>
NE	6	0,11	0,11	0,01	0,11	0,12			<i>ab</i>
NA	5	0,12	0,12	0,02	0,10	0,15			<i>b</i>
DE	6	0,13	0,13	0,01	0,12	0,14			<i>b</i>
DI	6	0,13	0,13	0,02	0,10	0,16			<i>b</i>
Total	27	0,12	0,12	0,02	0,09	0,16			

p-valor = 0,02

C

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	0,08	0,08	0,01	0,07	0,10	10,86	*	<i>a</i>
NE	6	0,09	0,09	0,01	0,08	0,10			<i>ab</i>
DE	6	0,10	0,09	0,02	0,08	0,12			<i>ab</i>
DA	6	0,10	0,10	0,01	0,08	0,11			<i>b</i>
DI	6	0,11	0,11	0,01	0,09	0,12			<i>b</i>
Total	30	0,10	0,10	0,01	0,07	0,12			

p-valor = 0,03

D

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	6	0,09	0,09	0,01	0,08	0,11	9,33	NS	
DE	5	0,10	0,10	0,01	0,09	0,11			
DA	6	0,10	0,10	0,01	0,09	0,11			
DI	5	0,10	0,10	0,00	0,10	0,11			
NE	5	0,11	0,11	0,01	0,10	0,12			
Total	27	0,10	0,10	0,01	0,08	0,12			

p-valor = 0,05

Apéndice 6. Resumen estadístico de la concentración de MDA en retinas de ratas diabéticas sometidas al extracto acuoso de *Phyllanthus niruri*. Abreviaciones: X: media, X: mediana, D.E.: desv. estándar, CMR: contraste múltiple de rango, KW: análisis de Kruskal-Wallis, A: 15 días, B: 30 días, C: 45 días, D: 60 días, NA: normal + agua, NE: normal + extracto, DA: diabetes + agua, DE: diabetes + extracto, DI: diabetes + insulina.

A

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR R
DI	6	0,16	0,17	0,11	0,01	0,29	18,24	*	<i>a</i>
DE	6	0,21	0,16	0,08	0,15	0,35			<i>ab</i>
DA	5	0,32	0,34	0,04	0,26	0,35			<i>bc</i>
NE	6	0,42	0,42	0,12	0,21	0,56			<i>cd</i>
NA	5	0,48	0,46	0,12	0,34	0,66			<i>d</i>

Total 28 0,31 0,32 0,16 0,01 0,66

p-valor = 0,001

B

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
DA	5	0,15	0,16	0,08	0,04	0,25	12,17	*	a
NA	5	0,31	0,32	0,06	0,23	0,36			b
DI	6	0,37	0,34	0,13	0,22	0,55			b
NE	5	0,40	0,42	0,05	0,32	0,46			b
DE	6	0,41	0,36	0,18	0,21	0,64			b
Total	27	0,33	0,32	0,15	0,04	0,64			

p-valor = 0,02

C

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NE	5	0,11	0,11	0,05	0,06	0,18	5,51	NS	
DI	6	0,18	0,16	0,09	0,09	0,35			
DA	5	0,20	0,21	0,06	0,13	0,27			
DE	6	0,27	0,19	0,23	0,05	0,58			
NA	6	0,32	0,19	0,23	0,14	0,66			
Total	28	0,22	0,17	0,17	0,05	0,36			

p-valor = 0,24

D

Condic. Experim	F	\bar{X}	X	D.E.	Mínimo	Máximo	KW	Dif. Sign.	CMR
NA	5	0,12	0,10	0,05	0,07	0,18	8,40	NS	
DE	6	0,14	0,12	0,08	0,04	0,27			
NE	5	0,14	0,16	0,05	0,08	0,22			
DA	6	0,18	0,19	0,07	0,08	0,27			
DI	6	0,37	0,26	0,29	0,12	0,88			
Total	28	0,20	0,16	0,17	0,04	0,88			

p-valor = 0,08

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>Phyllanthus niruri</i> (EUPHORBIACEAE) SOBRE LA RETINA DE RATAS DIABÉTICAS
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
LISCANO CARREÑO, AHIESKA AIMARA	CVLAC	15 290 905
	e-mail	aye27le@hotmail.com
	e-mail	aye27le@yahoo.com
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Phyllanthus niruri</i>
Diabetes
Retina
Estrés Oxidativo

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología
	Salud
	Bioquímica

Resumen (abstract):

En el presente trabajo se evaluaron la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y las concentraciones de glutatión reducido (GSH), metalotionina (MT) y malonaldehído (MDA) en la retina de ratas diabéticas tratadas con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* o huevito escondido. Se formaron 5 grupos experimentales: dos grupos de ratas normales, uno con agua (NA) y otro con el extracto de la planta (NE) y tres grupos diabéticos, uno con agua (DA), uno tratado con el extracto (DE) y otro tratado con insulina (DI) para los 15, 30, 45 y 60 días de tratamiento. Se extrajeron las retinas y fueron homogenizadas en buffer fosfato, para las determinaciones espectrofotométricas de las enzimas SOD y CAT; del GSH; MDA; y la concentración de MT; y para la realización de una electroforesis SDS-PAGE 15% de las fracciones citosólicas y de membrana. El extracto acuoso de la planta *P. niruri* demostró un efecto hipoglucémico en los grupos de ratas tratados con el mismo. La actividad de la enzima SOD ($4,92 \pm 0,85$ U/mg de proteínas), así como del GSH ($0,85 \pm 0,22$ nmol/mg de proteínas) en las ratas diabéticas tratadas con el extracto de la planta a los 60 días, fueron similares o superiores a los grupos normales (SOD: $4,44 \pm 0,58$ U/mg de proteínas y GSH: $0,88 \pm 0,10$ nmol/mg de proteínas), estableciéndose un efecto antioxidante. En las ratas tratadas con insulina se observó que esta tiende a incrementar el estrés oxidativo al aumentar

significativamente las concentraciones de GSH ($0,87 \pm 0,06$ nmol/mg de proteínas) y MT ($0,11 \pm 0,01$ ng/mg de proteínas) a los 45 días del bioensayo. En el grupo diabético sin tratamiento se observó un incremento altamente significativo en los niveles de CAT a los 60 días del experimento como mecanismo compensatorio a la hiperglucemia. En cuanto al MDA se observó diferencias significativas entre grupos solo a los 15 días del bioensayo, y a los 60 días las ratas diabéticas tratadas con insulina mostraron la concentración de MDA más elevada aunque no significativamente, para este parámetro el extracto de la planta no incrementó la peroxidación. En la electroforesis SDS-PAGE ocurrieron variaciones en la expresión de las bandas entre grupos que solo sugieren que pudiera haber alteraciones en algunas proteínas citoplasmáticas que podrían estar relacionadas con enzimas, factores proteicos u otras. Estos resultados sugieren que *P. niruri* ejerció efecto hipoglucémico y antioxidante en organismos diabéticos tratados con el mismo, contrarrestando los daños oxidativos en el tejido retiniano, estabilizando la defensa antioxidante del organismo.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Mairin Lemus	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	6 429 405
	e-mail	<u>Mlemus88@gmail.com</u>
	e-mail	
Luz M. Rojas	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	4 339 741
	e-mail	<u>Imarinarojas@yahoo.com</u>
	e-mail	
Sonia Nusetti	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11 380 086
	e-mail	<u>snusetti@yahoo.com</u>
	e-mail	
Francisco Rosa	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5 221 065
	e-mail	<u>Frankrosa29@yahoo.com</u>
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	07	31

Lenguaje: Esp

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_Liscano AA	Application/Word

Alcance:

Espacial : _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio:

Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente Núcleo de Sucre

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Los resultados de esta tesis no han sido publicados, por tanto no está permitida la reproducción total o parcial de esta tesis, su tratamiento informático, la transmisión de cualquier otra forma o por cualquier otro medio electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos sin previo permiso y por escrito del titular de este trabajo; solo se permite el acceso libre por vía digital al resumen del mismo.


ASESOR


AUTOR


COASESOR


JURADO 1


JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

