



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

Estudio bromatológico de hojas de *Moringa oleifera in vitro* y *ex vitro* y análisis del efecto hipoglucemiante en ratas *Wistar* diabetizadas.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

PRESENTA

L.N. OLGA KARINA AMADOR GARCÍA

TUTOR DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMINGUEZ

ASESOR DR. JAVIER VENTURA JUÁREZ

ASESOR M. C. FERNANDO BON ROSAS

CD. UNIVERSITARIA

NOVIEMBRE 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**OLGA KARINA AMADOR GARCÍA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**  
**PRESENTE.**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Estudio bromatológico del hojas de *Moringa oleífera in vitro* y *ex vitro* y análisis del efecto hipoglucemiante en ratas *Wistar* diabetizadas**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 25 de octubre de 2016

*"Se lumen proferre"*

**EL DECANO**

M. en C. **JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS**



c.c.p.- Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

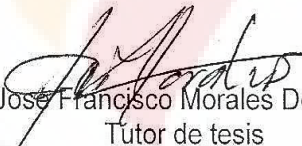
**M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS  
P R E S E N T E

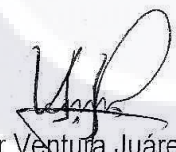
Por medio de la presente, como Comité Tutorial designado de la estudiante **Olga Karina Amador García** con ID **66371** quien realizó la tesis titulada: **Estudio bromatológico de Hojas de Moriga oleifera in vitro y ex vitro y análisis del efecto hipoglucemiante en ratas Wistar diabetizadas.**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

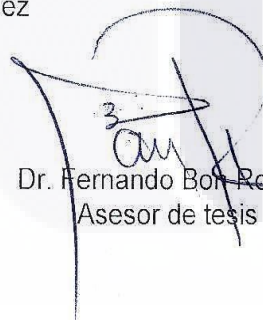
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 25 de octubre del 2016

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Tutor de tesis

  
Dr. Javier Ventura Juárez  
Asesor de tesis

  
Dr. Fernando Borja Rosas  
Asesor de tesis

c.c.p.- L. N. Olga Karina Amador García  
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balach Secretario Técnico

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el esfuerzo y cooperación de gran número de personas que gracias a su apoyo lo hicieron posible.

Le agradezco primeramente a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme nuevamente ser parte de la Institución y elegirme como estudiante del posgrado en pro de mi formación como profesional y como investigadora.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por elegirme como becaria con la finalidad de estimular y promover el desarrollo de la ciencia y la tecnología en nuestro país.

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez por compartir sus conocimientos, brindarme su apoyo, confianza y asesoría en la realización de esta investigación.

Al Dr. Javier Ventura Juárez por su sencillez, brindarme su apoyo en cada momento, brindarme asesoría y compartir sus conocimientos conmigo y estar siempre dispuesto a ayudar a todos y a cada uno de sus alumnos.

Al M. en C. Fernando Bon por su asesoría.

A la M. en C. Guadalupe Acero Godínez por su asesoría, brindarme apoyo y compartir sus conocimientos en la investigación en el área del bromatológico.

A la M. en C. Liliana Barba de Alba por su asesoría y apoyo en este proyecto en el área de Absorción de masas.

Al M. en C. Amalio Ponce Montoya por brindarme apoyo y un área especial en posta Zootécnica durante el proyecto, que sin este espacio no habría sido posible.

A la Dra. Liseth Aldaba por siempre estar dispuesta a ayudar a los alumnos, tener siempre una buena actitud y haberme enseñado muchos aspectos de modelos en animales.

A mis compañeros de maestría y doctorado y los técnicos de los laboratorios, por su apoyo y ayuda brindada en cada una de las etapas de esta investigación.

## DEDICATORIAS

A mis padres, por apoyarme en todo momento de mi vida.

A mi madre, por ser gran parte del motor de mis días, y motivarme cada día a ser mejor.

A mi Universidad, maestros y compañeros, que de cierta forma contribuyeron a mi formación académica.

A Pepe, por apoyarme en cada momento, impulsarme a seguir adelante y motivarme cuando sentía que no podía.

# ÍNDICE

AUTORIZACIONES

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1. Origen y distribución.....	3
2.2. Taxonomía y descripción morfológica de <i>Moringa oleífera</i> .....	4
2.3. Usos de <i>Moringa oleífera</i> .....	6
2.3.1. Comestibilidad.....	6
2.3.2. Corteza de tallo y resina.....	7
2.3.3. Raíz .....	7
2.3.4. Semilla.....	7
2.3.5. Producción de Biodisel .....	8
2.3.6. Propiedades farmacológicas .....	9
2.3.6.1. Efecto antimicrobiano y antihelmíntico.....	9
2.3.6.2. Antiparasitario .....	9
2.3.6.3. Actividad analgésica local y anestésica.....	9
2.3.6.4. Actividad antiinflamatoria.....	10
2.3.6.5. Actividad antioxidante y cardioprotectora.....	10
2.3.6.6. Actividad antihipertensiva y diurética.....	11
2.3.6.7. Activiad hipocolesterolémica .....	11
2.3.6.8. Actividad hepatoprotectora .....	12
2.3.6.9. Actividad hipoglucemiante .....	12
2.4. Contenido nutrimental de Moringa .....	13
2.4.1. Nutrientes.....	14
a) Proteínas; .....	14
b) Grasas;.....	15



c) Minerales; .....	17
<b>2.5. Desnutrición .....</b>	<b>17</b>
<b>2.6. Diabetes mellitus .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6.1. Definición .....</b>	<b>18</b>
<b>2.6.2. Clasificación .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6.3 Diagnóstico .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6.4. Complicaciones .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6.5. Factores de predisposición .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6.6. Prevalencia y Epidemiología .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6.7. Páncreas .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.7. Insulina .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6.8. Tratamientos para <i>Diabetes Mellitus</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.9. Tratamientos Alópatas .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.10. Sulfonilureas .....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.11. Biguanidas .....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.12. Inhibidores Alfa-Glucosidasa .....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.13. Meglitinidas .....</b>	<b>28</b>
<b>2.6.14. Tiazolidinedionas .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6.15. Terapia con insulina en diabetes tipo 2 .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6.16. Inhibidores de DPP-4 .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6.17. Diabetes Experimental .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6.18. Estreptozotocina .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6.19. Carboximetilcelulosa .....</b>	<b>32</b>
<b>2.7. Tratamientos con plantas medicinales .....</b>	<b>33</b>
<b>2.8. Cultivo De Tejidos Vegetales (CTV) .....</b>	<b>33</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
6.1 Propagación masiva <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> de moringa por cultivo de tejidos vegetales .....	38
<b>6.1.1. Material vegetal .....</b>	<b>38</b>
<b>6.1.2. Desinfección de semillas .....</b>	<b>38</b>
<b>6.1.3. Germinación .....</b>	<b>38</b>
<b>6.1.4. Propagación .....</b>	<b>38</b>

6.1.5. Enraizamiento y Aclimatación .....	39
6.2. Análisis bromatológico de hojas de moringa .....	39
6.2.1. Humedad .....	39
6.2.2. Extracto etéreo.....	39
6.2.3. Fibra cruda.....	40
6.2.4. Proteína cruda.....	40
6.2.5. Cenizas .....	41
6.2.6. Minerales .....	41
6.3. Extractos de hojas secas de moringa para tratamiento de ratas <i>Wistar</i> .....	41
6.3.1. Extracto Acuoso .....	41
6.3.2. Extracto Etanólico.....	41
6.3.3. Hoja pulverizada.....	42
6.4. Experimentos con ratas <i>wistar</i> diabetizadas y tratadas con extractos de hojas de moringa.....	42
6.4.1 Inducción de diabetes en ratas <i>wistar</i> .....	42
6.4.4. Toma de muestra sanguínea de ratas <i>Wistar</i> .....	44
6.4.5. Mediciones de química clínica en ratas <i>Wistar</i> .....	45
6.4.6. Histopatología.....	47
6.4.6.1. Tinción con hematoxilina eosina.....	47
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	48
8. RESULTADOS .....	49
8.1. Propagación <i>in vitro</i> .....	49
8.1.1. Desinfección, Propagación y Enraizamiento <i>in vitro</i> .....	49
8.1.2. Aclimatación.....	51
8.2. Propagación <i>ex vitro</i> .....	53
8.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y MINERALES .....	57
8.3 EXPERIMENTACIÓN CON RATAS <i>WISTAR</i> DIABETIZADAS.....	72
8.3.1 Primer experimentoen ratas <i>wistar</i> ; 50 mg/kg de STZ con dos refuerzos.....	72
8.3.2 Segundo experimento en ratas <i>Wistar</i> ; 50 mg/kg de STZ y un refuerzo	78
8.4 Histología.....	84
8.4.1 Primer experimento en ratas <i>wistar</i> ; 50 mg/kg de STZ con dos refuerzos.....	84
8.4.1.1 Histología de Páncreas .....	84
8.4.1.2 Histología del Riñón.....	85
8.4.2 Segundo experimentoen ratas <i>wistar</i> ; 50 mg/kg de STZ con un refuerzo .....	87



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

8.4.2.1 Histología del páncreas.....	87
8.4.2.2 Histología del Riñón.....	88
9. DISCUSIONES .....	90
10. CONCLUSIONES .....	103
11. REFERENCIAS .....	105
12. ANEXOS.....	118



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de aminoácidos entre hojas de moringa y carne de vacuno por cada 100 g. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Cuadro comparativo de análisis de nutrientes de hojas secas de moringa en diferentes países por cada 100 g. ....	16
<b>Tabla 3.</b> Grupos experimentales de tratamiento de ratas del primer experimento. ....	43
<b>Tabla 4.</b> Grupos experimentales de tratamiento de ratas del segundo experimento. ....	44
<b>Tabla 5.</b> Resumen de semillas germinadas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> . ....	56
<b>Tabla 6.</b> Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa <i>ex vitro</i> contra la referencia reportada en la literatura por cada 100 g. ....	69
<b>Tabla 7.</b> Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa <i>in vitro</i> contra la referencia reportada en la literatura por cada 100 g. ....	60
<b>Tabla 8.</b> Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa <i>ex vitro</i> contra las hojas <i>in vitro</i> por cada 100 g. ....	60
<b>Tabla 9.</b> Reporte del análisis bromatológico de micronutrientes de hojas secas de moringa <i>ex vitro</i> contra las hojas de referencia por cada 100 g. ....	61
<b>Tabla 10.</b> Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa <i>in vitro</i> contra hojas de referencia. ....	62

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

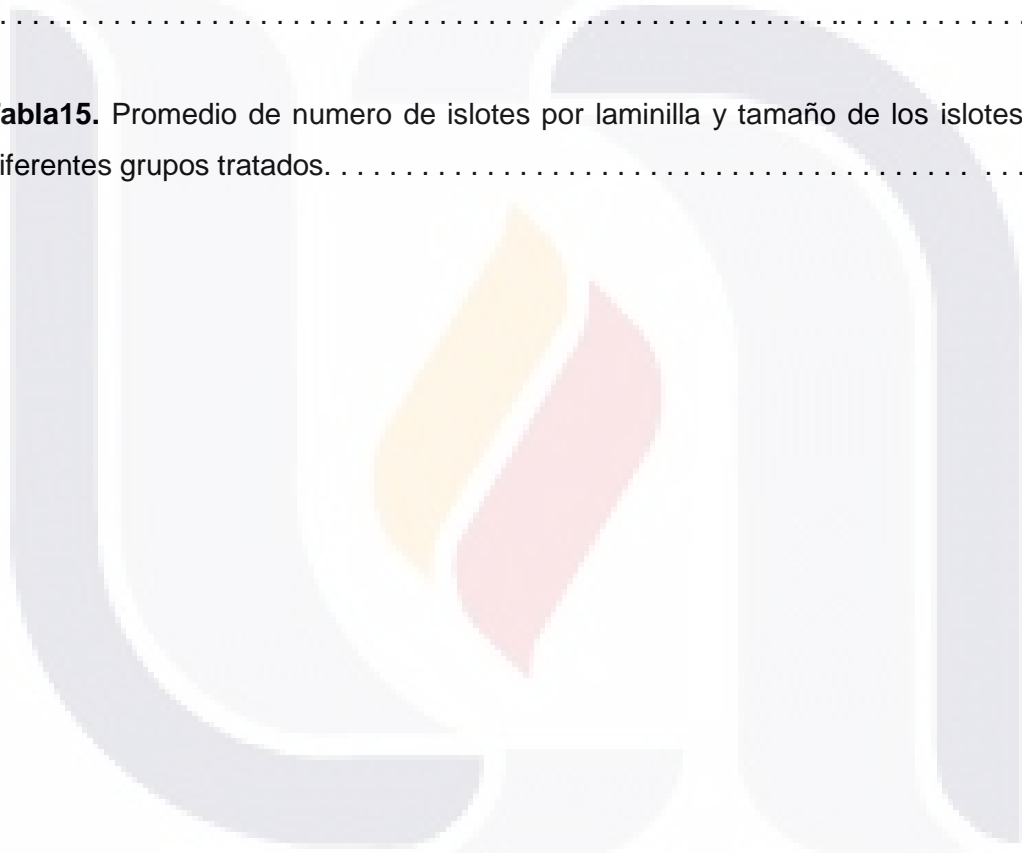
**Tabla 11.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa *ex vitro* contra las hojas *in vitro* y referencia. . . . .63

**Tabla 12.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas frescas de moringa; *ex vitro*, *in vitro* y referencia por cada 100 g. . . . . 67

**Tabla 13.** Reporte del análisis bromatológico de micronutrientes hojas frescas de moringa; *ex vitro*, *in vitro* y referencia por cada 100 g. . . . . 67

**Tabla 14.** Cuadro comparativo de ciertos alimentos y su máximo contenido de nutrientes contra moringa por cada 100 g de muestra de hojas secas y hojas frescas. . . . . 71

**Tabla15.** Promedio de numero de islotes por laminilla y tamaño de los islotes en los diferentes grupos tratados. . . . . 85



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localidades y distribución potencial del cultivo de <i>Moringa oleifera</i> en México. ....	4
<b>Figura 2.</b> Diferentes partes del árbol de <i>Moringa oleifera</i> . ....	5
<b>Figura 3.</b> Prevalencia de <i>Diabetes mellitus</i> en el mundo. ATLAS de la DIABETES de la Federación Internacional de Diabetes 2013. ....	24
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción de la Insulina. ....	31
<b>Figura 5.</b> Semillas a la izquierda semillas de Guanajuato y Baja California Sur. ....	49
<b>Figura 6.</b> Semillas de <i>Moringa oleifera</i> con testa. ....	50
<b>Figura 7.</b> Etapas de propagación de moringa. ....	51
<b>Figura 8.</b> Pántulas generadas in vitro. ....	52
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de supervivencia de plántulas in vitro aclimatadas de tres localidades. ....	53
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de germinación de semillas <i>ex vitro</i> . ....	53
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de germinación de semillas <i>ex vitro</i> en condiciones de laboratorio. ....	54
<b>Figura 12.</b> Propagación de plantas de <i>Moringa oleifera</i> aclimatadas en invernadero, tanto in vitro como <i>ex vitro</i> . ....	57
<b>Figura 13.</b> Hojas secas de moringa oleífera tomadas de árboles <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> . . . .	58

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

**Figura 14.** Porcentajes de macronutrientes presentes en hojas secas de moringa ex vitro, in vitro y la referencia. ....64

**Figura 15.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas secas de moringa, ex vitro, in vitro y la referencia. ....65

**Figura 16.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas secas de moringa, ex vitro, in vitro y la referencia reportada en la literatura. ....66

**Figura 17.** Porcentaje de macronutrientes presentes en hojas frescas de moringa, ex vitro, in vitro y la referencia. ....68

**Figura 18.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas frescas de moringa K, Na, Ca, Mg. ....69

**Figura 19.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas frescas de moringa Cu, Fe, Mn y Zn. ....70

**Figura 20.** Niveles de glucosa en mg/dL por día del tratamiento del primer experimento. ....73

**Figura 21.** Niveles de colesterol en mg/dL por día del tratamiento del primer experimento. ....74

**Figura 22.** Niveles de triglicéridos en mg/dL por día del tratamiento del primer experimento. ....75

**Figura 23.** Niveles de proteína en g/dL por día del tratamiento del primer experimento. ....76

**Figura 24.** Niveles de concentración de insulina en ng/mL por día del tratamiento del primer experimento. ....77

**Figura 25.** Pesos en gramos de las ratas por día del tratamiento del primer experimento. ....78

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

<b>Figura 26.</b> Niveles de glucosa en mg/dL por día del tratamiento del segundo experimento. ....	79
<b>Figura 27.</b> Niveles de colesterol en mg/dL por día del tratamiento del segundo experimento. ....	80
<b>Figura 28.</b> Niveles de triglicéridos en mg/dL por día del tratamiento del segundo experimento. ....	81
<b>Figura 29.</b> Niveles de concentración de insulina en ng/mL por día del tratamiento del segundo experimento. ....	82
<b>Figura 30.</b> Pesos en gramos de las ratas por día del tratamiento del segundo experimento. ....	83
<b>Figura 31.</b> Corte histológico del páncreas con tinción de hematoxilina-eosina a 20X . . . . .	84
<b>Figura 32.</b> Corte histológico de corte de riñón con tinción de hematoxilina-eosina en aumento 20X del primer experimento. ....	86.
<b>Figura 33.</b> Corte histológico del páncreas con tinción de hematoxilina-eosina 20X, segundo experimento. ....	87
<b>Figura 34.</b> Corte histológico de corte de riñón con tinción de hematoxilina-eosina, segundo experimento. ....	89



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association
AMD	Asociación Mexicana de Diabetes
ATP	Adenosin Trifosfato
CAD	Coronary artery disease
CDC	Centro de Control de Enfermedades
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM sin Tx (C)	Ratas con <i>Diabetes Mellitus</i> sin Tratamiento.
DM+METF (F)	Ratas con <i>Diabetes Mellitus</i> y tratadas con Metformina 350 mg/kg.
DM+MOEE (D)	Ratas con <i>Diabetes Mellitus</i> tratadas con 300 mg/kg de extracto etanólico de moringa.
DM+MOEE (D)	Ratas con <i>Diabetes Mellitus</i> tratadas con 300 mg/kg de extracto etanólico de moringa.
DM+SITAGLIPTINA (F)	Ratas con <i>Diabetes Mellitus</i> y tratadas con Sitagliptina 100 mg/kg.
DM+MOEA (I)	Ratas con <i>Diabetes Mellitus</i> tratadas con 300 mg/kg de extracto acuoso de moringa
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> Gestacional
DPP-4	Deptil-peptidasa-4
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Frecuencia cardíaca
FIDA	Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola
FPG	Glucosa Plasmática en ayunas (fasting plasma glucose)
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Glucagon Like Peptide-1 o GLP-1
GLUT 1.	Transportador de glucosa 1
GLUT 4.	Transportador de glucosa 4
Hb A1C	Hemoglobina glicosilada Hb A1C)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IFG.	Trastorno de la glucosa en ayuna
IGT	Trastorno de la tolerancia a la glucosa
IMC	Índice de masa corporal
IP	Intraperitoneal

ISP	Isoproterenol
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAO	Monoamino oxidasas
MAP	Presión arterial media
Mg/dL	Miligramos por decilitro
MS	Medio nutritivo Murashige y Skoog
ND	Nefropatía diabética (ND)
OGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa (oral glucose tolerance test)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAD	Enfermedad vascular periférica (peripheral arterial disease)
PFDVI	Presión diastólica final del ventrículo izquierdo
PMA	Programa Mundial de Alimentos
STZ	Esteptozotocina
SUR1.	Subunidad receptora de sulfonilureas
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos United States Department of Agriculture
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WFP	Programa Mundial de Alimentos

## RESUMEN

En este estudio se realizó una propagación masiva *in vitro* y *ex vitro* de plantas de *Moringa oleifera* provenientes de tres localidades mexicanas sin reguladores de crecimiento. Con las hojas frescas y secas de plantas de moringa *in vitro* y *ex vitro*, se realizó un estudio de composición nutrimental de; macronutrientes, proteína cruda, grasas, cenizas, extracto libre de nitrógeno (carbohidratos contenidos en el alimento), fibra cruda y aporte energético, además se observó que existe diferencia significativa de proteína, entre hojas *ex vitro* con la reportada en la literatura, más no en las *in vitro*, no existe diferencia en aporte nutrimental de macronutrientes (cenizas, grasa y fibra) entre ambas hojas comparadas con la literatura, sin embargo, las hojas *in vitro* son significativamente más ricas en Potasio y Sodio que las *ex vitro*, y no existe diferencias en el contenido de Cobre, Hierro, Zinc y Calcio de hojas *in vitro* y *ex vitro*. Para la ganancia de peso, se utilizaron ratas wistar adicionando a la dieta hojas de moringa; al final de este experimento, se observó que no hay diferencia de peso entre las ratas tratadas con los controles ni en el contenido de proteínas totales. Para analizar el efecto hipoglucemianate de hojas de moringa, se diabetizaron ratas hembras wistar con estreptozotocina; el resultado de este análisis mostró una leve reducción de glucosa sanguínea cuando se administraron extractos de moringa, en cambio para el análisis lipolipidémico se observó un efecto positivo en la reducción de colesterol y triglicéridos con extractos de moringa. A las ratas tratadas en todos los experimentos, se les hicieron cortes histológicos de páncreas y riñón para conocer la histopatología de la enfermedad y se observó que los extractos de moringa actúan como protectores de los islotes pancreáticos y protectores contra el de daño renal.

## ABSTRACT

In this study a massive *in vitro* and *ex vitro* propagation of *Moringa oleifera* plants from three Mexican localities without growth regulators was carried out. A study of nutritional composition quantifying; macronutrients, crude protein, fats, ashes, nitrogen-free extract (carbohydrates contained in food), raw fiber and energy supply was conducted also it was observed that there is a significant difference of protein, between leaves *ex vitro* with the reports in the literature, but not *in vitro*, there is not difference in nutritional contribution of macronutrients (ash, fat and fiber) between *in vitro* and *ex vitro* leaves compared to the literature, however, the *in vitro* leaves have significantly more content in Potassium and Sodium than *ex vitro* and there is no difference in the content of Copper, Iron, Zinc and Calcium of leaves *in vitro* and *ex vitro*. For the weight gain, wistar rats were used adding moringa leaves to their diet. At the end of this experiment, it was observed that there is not difference in weight between the rats treated with the controls nor in the concentrations of total protein in serum. To analyze the hypoglycemic effect of moringa leaves, wistar female rats were diabetized with streptozotocin. As a result from this analysis a slight reduction of blood glucose when administered moringa extracts was found. On the other hand, a positive effect on the reduction of cholesterol and triglycerides with moringa extracts was observed in the analysis. In relation to the rats treated in all experiments, histological sections of the pancreas and kidney were made to know the histopathology of the disease and it was observed that the moringa extracts act as protector of the pancreatic islets and protects against the damage of the kidney.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el mundo existe alimento suficiente para poder satisfacer a toda la población, sin embargo, sufren de hambre más de mil millones de personas (FAO, 2010) a nivel mundial. La inseguridad alimentaria afecta a comunidades en las que la pobreza impide un acceso garantizado a los alimentos. Aparte de causar un sufrimiento humano, la inseguridad alimentaria provoca la degradación y el agotamiento de los recursos naturales, migraciones a áreas urbanas en distintos países y por ende problemáticas políticas y económicas (Villareal & Ortega, 2014).

En los últimos años se han buscado más herramientas y alimentos que pueden beneficiar a la población que viven en zonas de mayor escases de alimentos y mayor tasa de problemas de malnutrición. La desnutrición es una condición patológica sistémica reversible como resultado de la deficiencia de nutrientes que se acompaña con distintas manifestaciones clínicas y diferentes grados de seriedad. Caracterizada por la pérdida de peso o masa, ya sea en un porcentaje menor o alto debido a la asimilación deficiente de alimentos por el organismo, por deficiencia de calidad o por deficiencia de cantidad de los alimentos consumidos (Gómez, 2003). La deficiencia de nutrientes, no es específico de una situación de desnutrición, sin embargo, se presenta con frecuencia, el 30% de todas las mujeres embarazadas sufren de deficiencia de Hierro (OMS). Se estima que en el mundo 178 millones de niños menores de cinco años sufren de desnutrición crónica, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012), el 21% de la población rural infantil menor de 5 años en México esta desnutrida y el 11% en zonas urbanas. La prevalencia reportada de anemia en niños de 1 a 4 años en el año 2006 fue de 23.7%, por deficiencia de Hierro 26% y deficiencia de Zinc 28%, en esa edad en una etapa crítica para el crecimiento y el desarrollo (Rivera 2012).

La *Diabetes Mellitus* (DM) es una enfermedad crónica de causas múltiples, que se está convirtiendo en una epidemia del siglo XXI, estimaciones de la OMS refieren que en el año 2010; 285 millones de personas en el mundo sufrían de DM, en 2012; 347 millones, de seguir así se estima que en año 2030 existirán más de 438 millones con este padecimiento. En México; según la ENSANUT 2012 existen más de 6.4 millones de personas que han sido diagnosticados con esta enfermedad, y desafortunadamente va en aumento, en México y en todo los países se presenta la misma problemática. Esta enfermedad representa, una las primeras causas de muerte

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en México. Según datos de la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México colocados en este orden, son los países con mayor número de casos (Hernández-Ávila *et al.* 2013).

*Moringa oleífera* es un árbol originario del sur del Himalaya, el nordeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán (Pérez *et al.*, 2010) y se ha adaptado en México en varias zonas del pacífico y el Caribe. Las hojas de moringa entre otras partes del árbol resultan ser es una buena fuente de proteína altamente digestible, rica en diversos minerales como Calcio, Hierro, y vitaminas del complejo B, A y C. Moringa es consumida en muchas regiones en desarrollo, donde la desnutrición es un problema importante. La moringa puede emplearse como fuente alimentaria y se le han atribuido diversas propiedades medicinales tales como cardíacos, circulatorios, procesos antitumorales, antihipertensivos, hepatoprotectores, se dice que es usado para tratar las dislipidemias, y es usada como buena fuente de antioxidantes y sustancias con actividad antibacteriana y antifúngica (Rizky *et al.*, 2013).

Las hojas de moringa contienen proteínas que podrían ser una opción para el consumo de los infantes en zonas rurales, ya que aporta aminoácidos esenciales para el sano desarrollo y crecimiento en esta etapa de la vida (Pérez *et al.*, 2010). Los estudios de composición de alimentos de hojas secas, hojas frescas, otras partes de la planta y harina de moringa provenientes de India y África, reportan un alto contenido en proteínas, vitamina A y C, Calcio, Hierro, Potasio, Zinc (Pérez *et al.*, 2010; Dhakar *et al.*, 2011).

Existen estudios de moringa en otras partes del Mundo con diferentes climas y suelos, sin embargo, hace falta realizar estudios en la composición de nutrientes de árboles localizados en México para conocer su valor nutrimental y además saber si existen diferencias entre regiones y poder utilizar este árbol como fuente alimenticia rica en nutrientes y satisfacer las necesidades y requerimientos nutricionales de la población Mexicana. Así mismo, estudiar el efecto hipoglucemiante de moringa en un modelo de diabetes experimental. Debido a que moringa no es originaria de México, una manera de tener ejemplares es la propagación masiva, una forma de hacerla y generar las condiciones artificiales adecuadas es la propagación *in vitro*.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Origen y distribución

*Moringa oleífera Lam.*, conocido comúnmente como palito de tambor, Marango, resedá, árbol de rábano (horseradish tree), árbol de baqueta (drumstick tree), ángela, árbol de los espárragos, árbol de las perlas, árbol, rábano picante, bean oil tree, y otros nombres es nativa del sub-Himalaya y del noroeste de la India, Pakistán, Bangladesh y Afganistán, Asia Menor, África y Arabia (Reyes & Ledin 2006; Rizky *et al.* 2013; Villareal & Ortega 2014). Actualmente, se distribuye en Indonesia, Filipinas, Tailandia, Cambodia (Rizky *et al.*, 2013), y desde México a Perú, así como en el Caribe (Falasca & Bernabé 2008). Se le puede localizar de forma silvestre y cultivada, el árbol se desarrolla bien en un clima tropical, húmedo, entre temperaturas oscilando entre los 12 y 40 °C. Moringa crece bien en zonas cercanas a ríos y arroyos, pero también en climas y suelos secos y cálidos. Este árbol resiste sequías pero no a las temperaturas bajas y existe la tendencia a perder las hojas bajo estrés hídrico, es un árbol caducifolio, se beneficia de riegos esporádicos, así como de algún tipo de fertilizantes ya que no es un árbol fijador de Nitrógeno (Magaña, 2012; Rizky *et al.*, 2013;).

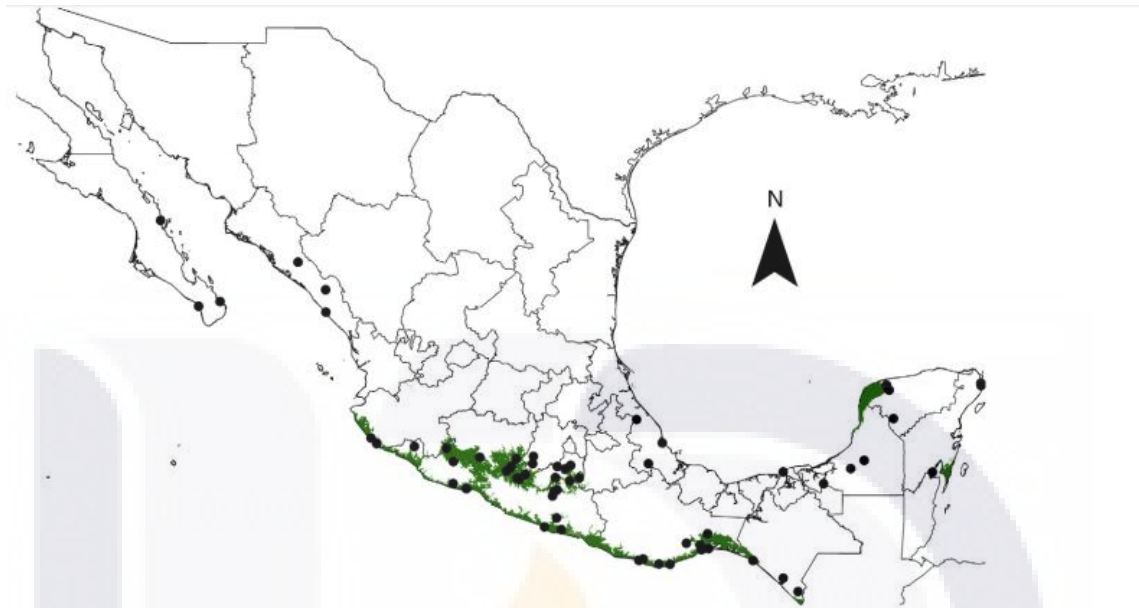
Moringa se ha usado como alimento y se le atribuyen múltiples usos medicinales. Los romanos, griegos y egipcios extrajeron aceite comestible de las semillas y lo usaron para perfume y lociones. En el Siglo XIX, a partir de plantaciones de moringa en el Caribe exportaron el aceite extraído de la semilla hacia Europa para perfumes y lubricantes para maquinaria (Falasca & Bernabé, 2008).

En México, ya es parte de la horticultura tradicional desde hace tiempo y se distribuye por la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California (La Paz y de Todos Santos). Olson & Fahey (2011), comentan que la planta llegó por primera vez a México en barcos de marinos filipinos en viajes proveniente de China, siendo probable que fuera utilizada como alimento de la tripulación.

Los ejemplares de moringa son abundantes y frondosos en las llanuras cálidas en el sur de Tehuantepec, también, se cultiva en la región central de Chiapas, y en las cercanías de Apatzingán y otras regiones del país (Olson & Fahey 2011). Moringa es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un alimento importante para ciertas comunidades, como en la India, Indonesia, Filipinas, Hawaii y en gran parte de África (Rizky *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Localidades y distribución potencial del cultivo de *Moringa oleifera* en México. Los puntos negros indican las 67 localidades donde se ha documentado. *M. oleifera* como parte de la horticultura tradicional. Las zonas sombreadas corresponden a las zonas con alta probabilidad de tener clima ideal para su cultivo (Olson & Alvarado-Cárdenas 2016).

## 2.2. Taxonomía y descripción morfológica de *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* Lam. fue descrita por Jean-Baptiste Lamarck, es una especie pertenece a la familia de la *Moringaceae*, junto con otras 14 especies, siendo la más importante *Moringa oleifera*. Es un árbol delgado, perenné, de muy rápido crecimiento, puede crecer más de tres metros en su primer año y alcanzar entre 7-12 m de altura y tiene entre 20-40 cm de diámetro (Figura 2A). Es un árbol poco longevo puede vivir hasta 20 años, aunque hay variedades en la India que son anuales; tiene una copa abierta y ramas espaciadas inclinadas y frágiles, corteza con un aspecto corchoso. Posee un follaje de hojas compuestas pinnadas, de color verde claro, con una longitud de 30 a 60 cm (Figura 2D), divididas en folíolos dispuestos en raquis, en las articulaciones de cada raquis se encuentran pequeñas glándulas; sus flores son bisexuales, están agrupadas en grandes panículas axilares; cinco pétalos, blancos con estambres amarillos. Florece a los 7 meses de su plantación. Los frutos son vainas que miden entre 10-40 cm de largo, cuando se secan son de color marrón oscuro, son cápsulas trilobuladas, leñosas (Figura 2C) y cuando se abren, contienen

una cantidad variable de semillas, dependiendo la longitud de la vaina, aproximadamente de 12 a 25 semillas por fruto y cada árbol puede producir de 15 000 a 25 000 por año, las semillas son de color pardo oscuro, globulares de 0.5 -3 cm de diámetro (Figura 2E) con alas café claro (Reyes *et al.*,2006; Falasca & Bernabé 2008; Olson & Fahey 2011).



**Figura 2.** Diferentes partes del árbol de *Moringa oleifera*. A) Árbol de *Moringa oleifera* maduro). B) Vainas jóvenes de moringa. C) Vainas secas abiertas de moringa D) Hojas frescas de moringa. E) Semillas maduras (Williams 2013; FAO 2015).



## 2.3. Usos de *Moringa oleifera*

### 2.3.1. Comestibilidad

*Moringa oleifera* se considera un producto alimenticio importante en su lugar de origen, recientemente ha llamado la atención por su aporte nutricional y las investigaciones acerca de sus propiedades farmacológicas. Las hojas, frutos, flores y vainas inmaduras de este árbol se utilizan por su alto valor nutritivo en muchos países, en particular en la India, Indonesia, Filipinas, Hawaii y muchas regiones de África (Habibie *et al.*, 2012). En Indonesia, se conoce como "la mejor amiga de la madre", por su utilización para incrementar la producción de leche durante la lactancia y, a veces se prescribe para la anemia (Habibie *et al.*, 2012).

Las vainas (frutos jóvenes) son comestibles, se consumen en sopas y diferentes guisados y tienen el sabor a habichuelas. En Haití y en la India, se comercializan congeladas y frescas. Las hojas son de sabor agradable usadas en guisados por ejemplo, o consumidas frescas en ensaladas, o diferentes potajes. Las hojas tienen un alto contenido de vitaminas, minerales y proteínas, con un perfil de aminoácidos esenciales balanceado, y buen aporte de vitaminas A, C y antioxidantes y de las hojas se obtienen extractos como polvos e infusiones. Debido a su adaptabilidad y bajo costo de producción, parece ser un alimento con buen pronóstico para el futuro, además presenta un 70.5 % de digestibilidad aparente de materia seca y 65.5 % de digestibilidad aparente de proteína (Nahid *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2010; Guevara, 2012; Farroq *et al.*, 2012; Magaña 2012).

Las semillas se pueden consumir maduras o verdes, secas y tostadas, en polvo, como té o y son muy nutritivas, tienen un alto valor comercial en la India, donde son exportadas enlatadas, de las semillas se extrae aceite, comestible de muy buena calidad y lubricante de alta calidad, el aceite de semilla han sido utilizados para varias enfermedades la medicina indígena del sur de Asia (Gassenschmidt, *et al.*, 1995; Olson, 2011; Guevara, 2012; Habibie *et al.*, 2012).

Las flores se pueden comer en fresco o comúnmente usadas en tisanas por la medicina tradicional para algunas enfermedades cardiovasculares ya que reduce los niveles de colesterol, triglicéridos, y las hojas son usadas como antiinflamatorio

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

también (Nair & Subramanian, 1962; Bhattacharya et al., 1982; Dahot, 1998; Siddhuraju and Becker, 2003; Mehta *et al.*, 2003).

Todas las partes son usadas por la medicina tradicional de la India; como las hojas, raíces, semillas, flores, frutos y las cortezas del árbol, goma y las vainas inmaduras.

### **2.3.2. Corteza de tallo y resina**

La corteza del tallo se utiliza también en tisanas como un analgésico, en enfermedades oculares, y tiene actividad antituberculosa (Bhatnagar *et al.*, 1961; Siddhuraju & Becker, 2003). La goma o resina es usada contra caries dentales, es astringente y rubefaciente, para tratar a pacientes con sífilis y afecciones reumáticas (Fuglie, 2001).

### **2.3.3. Raíz**

Las raíces son usadas en la medicina tradicional para fertilidad, procesos antiinflamatorio, laxante, afecciones como reumatismo, inflamaciones, dolores articulares, sacrolumbalgia. La raíz se aplica externamente como una cataplasma en casos de inflamación (Farooq *et al.*, 2007).

El efecto de la aplicación oral de extractos acuosos y alcohólicos de raíz de moringa han sido estudiados en ratas albinas *Wistar* macho y redujo significativamente el oxalato urinario elevado, que muestra una acción reguladora sobre la síntesis de oxalato endógeno. El aumento de la deposición de los componentes de la formación de cálculos renales también se redujo significativamente por el tratamiento curativo y preventivo utilizando extractos acuosos y alcohólicos. Los resultados indican que la raíz de *Moringa oleifera* tiene actividad antiurolitiásico (Williams *et al.*, 2013).

En el área culinaria, las raíces son utilizadas normalmente como condimento, por su sabor picante, ya que vienen de la misma familia que el rábano (Guevara, 2012).

### **2.3.4. Semilla**

La semilla contiene un 35-40 % de aceite, de alta calidad, el perfil indica que el 73% es ácido oleico. Es empleado en cocina, no se vuelve rancio. También, es empleado para lubricación, esto significa que el aceite de moringa tiene el mismo nivel de calidad que el aceite de oliva. Las pruebas de laboratorio indican que la pasta que queda después de la extracción del aceite contiene los ingredientes activos de efecto coagulante, este puede considerarse un subproducto de la extracción del aceite (Gassenschmidt, *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 2010; Magaña 2012). Las semillas tienen los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mejores floculantes naturales conocidos y se emplean en la depuración de aguas fluviales, aguas turbias y purificación de agua potable. Las semillas trituradas son un reemplazo viable de coagulantes sintéticos, la efectividad de coagulación de las semillas de moringa varía en función de la turbidez inicial, siendo que puede reducir entre el 92% y 99% (Berger *et al.*, 1984; Olsen, 1987; Gassenschmidt, *et al.*, 1995; Olson & Fahey 2011; Magaña, 2012).

Las semillas de moringa son fuentes de lecitina y debido a que las lecitinas enlazan a los peptidoglicanos y lipopolisacáridos en la pared celular bacteriana, la lecitina del agua soluble de moringa es separada y reduce la turbidez del agua, se sugiere que la lecitina puede actuar como coagulante de bacterias que no las inactiva (Beltrán & Sánchez 2008; Santos *et al.*, 2010; Umesha *et al.*, 2013) han estudiado la eliminación de laurilsulfato de sodio por coagulación/floculación con extracto de semilla de moringa y encontraron la capacidad del extracto para retirar un agente tensioactivo aniónico como el lauril sulfato de sodio, el cual se eliminó a partir de soluciones acuosas de hasta 80 %, a través del proceso de coagulación/floculación. Este trabajo indicó que la utilización del *Moringa oleífera* es comparable al sulfato de aluminio. Las semillas de moringa también, tienen propiedades suavizantes, además de ser un corrector de pH (reducción de alcalinidad), se emplea en la clarificación de miel y del jugo de caña de azúcar (Farooq *et al.*, 2007; Magaña 2012).

### **2.3.5. Producción de Biodiesel**

Se ha investigado el aceite de *Moringa oleífera* como una posible fuente de biodiesel. “El biodiesel se obtuvo a partir de aceite de semillas de moringa por medio de álcali-catalizada de trans-esterificación con metanol ácido después de pre-tratamiento y como resultado, los ésteres metílicos (biodiesel) obtenidos muestran un alto número de cetano de aproximadamente 67, uno de los más altos encontrados para un combustible biodiesel”. El aceite moringa parece ser un sustituto aceptable para el diésel de petróleo y para los combustibles de biodiesel derivado de aceites vegetales (Farooq *et al.*, 2008; Knothe *et al.*, 2008; Moser *et al.*, 2008; Rashid *et al.*, 2008;)



### **2.3.6. Propiedades farmacológicas**

#### **2.3.6.1. Efecto antimicrobiano y antihelmíntico**

Se encontró que los extractos acuosos de moringa de hojas y flores actúan como inhibitorios contra muchas bacterias patógenas tales como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los aceites y extractos tienen también actividad anti-fúngica (Chuang *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2012; Fatima *et al.*, 2014). Un estudio realizado por Chuang *et al.*, (2007) utilizó extracto etanólico de hojas, semillas y flores, mostró la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Salmonella typhi* A, *S. aureus*, *Streptococcus* y *Candida albicans*. Varios componentes son los responsables de la actividad antihelmíntica incluyendo; niazirin, glucósido, niazirin y tres glucósidos de aceite de mostaza, niaziminin A, B y 4- [4 'O acetil- $\alpha$ -L rhamnosyloxy) bencil] isotiocianato aislado de hojas y de vainas enteras; D-glucosa, D-manosa, ácido ascórbico, la proteína y el polisacárido aislado de flores maduras; 0-[2'-hidroxi-3'-(2''-heptenyloxy)] propilo dodecanoato, metil-p-hidroxibenzoato, tiocarbamatos, isotiocianato, nitrilos, 0-etil-4 - [( $\alpha$ -1-rhamnosyloxy) bencil] carbamato, y  $\beta$ -sitosterol. Otros compuestos bioactivos, tales como Spirochin y Anthonine se encuentran en la raíz y son activos contra varias bacterias (Chuang *et al.*, 2007).

#### **2.3.6.2. Antiparasitario**

Los parásitos representan un problema severo para la industria de la ganadería por sus grandes pérdidas. Se ha utilizado moringa como tratamiento contra ciertos parásitos como Dracunculosis (gusano de Guinea), esquistosomas y tripanosomas, los extractos han tenido un buen resultado y se pueden emplear como una alternativa de tratamiento contra helmintiasis en poblaciones humanas y en animales de granja (Chuang *et al.*, 2007).

#### **2.3.6.3. Actividad analgésica local y anestésica**

Los extractos alcohólicos y varias fracciones de extracto de éter de petróleo, acetato de etidio, dieter de etidio, muestran una potente actividad analgésica comparada con la aspirina 25 mg/kg de peso corporal, los extractos de las semillas poseen una marcada actividad analgésica. Se han realizado experimentos en cerdos

guinea y ranas con extracto metanólico de Moringa para comprobar el efecto de anestesia local (Biswas *et.al* 2012).

#### **2.3.6.4. Actividad antiinflamatoria**

Algunas partes de Moringa tienen actividad anti-inflamatoria por ejemplo, el extracto de raíz mostró significativa reducción en la inflamación inducida de la pata de rata *Wistar*. Por otra parte, el extracto de n-butanol de las semillas mostró actividad antiinflamatoria en vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en los conejillos de indias (Mahajan *et al.*, 2009).

Mejorar enfermedades inflamatorias crónicas es posible con los presentes bioactivos de moringa, como consecuencia, esta planta muestra efectos beneficiosos en el asma, el dolor y otros síntomas resultantes (Farooq *et al.*, 2012).

#### **2.3.6.5. Actividad antioxidante y cardioprotectora**

Farooq *et al.*, (2012) reportaron que las hojas de moringa son ricas en antioxidantes, los extractos metanólicos y etanólicos de hojas, vainas y semillas tienen 65 y 66.8 % de antioxidantes respectivamente. Los responsables de esta actividad son los compuestos fenólicos como quercetina y kaemferol. Estudios por Ogbunugafor *et al.*, (2011) compararon el poder antioxidante del aceite de moringa contra el aceite de palma y descubrieron que las semillas de moringa son superiores para captación de radicales libres. Algunos de los compuestos encargados de este efecto son los glucosinolatos, isotiocinatos, tiocarbamatos y flavonoides. Estos compuestos reprimen a los ROS quelando iones de metal y regenerando antioxidantes unidos a la membrana (Biswas *et.al* 2012).

Nandave *et al.*, (2009), realizaron un experimento para evaluar el efecto cardioprotector del extracto liofilizado hidroalcohólico de hojas de moringa en el modelo inducido por isoproterenol (ISP) de infarto de miocardio en ratas macho *Wistar* con 200 mg/kg durante 1 mes, el tratamiento crónico con moringa demostró efectos atenuantes en daños hemodinámicos inducidos por ISP (presión arterial media MAP), la frecuencia cardíaca (FC), la presión final diastólica del ventrículo izquierdo (PFDVI), y el pico del ventrículo izquierdo positivo, el tratamiento crónico con moringa resultó significativo en la modulación favorable de las enzimas bioquímicas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, lactato deshidrogenasa, y la creatina quinasa-MB), pero no pudieron demostrar ningún efecto significativo sobre el glutatión reducido en comparación con el grupo de control con ISP. En este estudio se demostró

que moringa posee efecto cardioprotector, que puede atribuirse a sus propiedades antioxidantes, antiperoxidativas, y conservantes miocárdicas (Nandave *et al.*, 2009).

#### **2.3.6.6. Actividad antihipertensiva y diurética**

Las hojas de moringa contienen varios compuestos bioactivos, que ejercen un efecto directo en la presión sanguínea, y por lo tanto éstos se pueden utilizar para la estabilización de la presión arterial. Los compuestos encargados del efecto hipotensor se encuentran en las hojas, dichos compuestos son nitrilo, glucósidos y tiocarbamatos. Además, la actividad diurética de moringa se debe a compuestos presentes en las raíces, hojas, flores y la infusión acuosa de semillas (Farooq *et al.*, 2012).

La raíz de moringa reduce el oxalato urinario elevado y baja el depósito de los componentes formadores de cálculos en los riñones de ratas formadores de cálculos renales (Abdulrahman *et al.*, 2014).

#### **2.3.6.7. Actividad hipocolesterolemica**

Estudios realizados por Chumark *et al.*, (2008), demostraron el efecto hipocolesterolemico del extracto acuoso de hojas de moringa sobre los radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), y el efecto inhibidor sobre  $\text{Cu}_2^+$  en la oxidación inducida por lipoproteínas de baja densidad (LDL). En este estudio se evaluaron los niveles de colesterol y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y formaciones de placa de ateroma en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol. Como resultado, los conejos hipercolesterolemicos, a las 12 semanas de tratamiento, sus niveles de colesterol redujeron significativamente la formación de placa aterosclerótica a aproximadamente 50 y 86% comparados con el control, respectivamente, estos resultados fueron comparables a los de la simvastatina. Los resultados indicaron que esta planta posee actividades antioxidantes, hipolipidémicos y antiateroscleróticos y tiene potencial terapéutico para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

En otro estudio realizado por Ghasi *et al.*, (2000), alimentaron ratas *Wistar* con una dieta rica en grasas durante 30 días y evaluaron las diferencias entre animales con y sin extracto acuoso de hojas de moringa y una dosis diaria de 1000 mg/kg de peso corporal; en ratas sin tratamiento, incrementó un 30% su contenido de grasa en sangre principalmente colesterol total, mientras que las tratadas con extracto, solo incrementó un 14%. Otro estudio realizado por Jain *et al.*, (2010) con extractos

metanólicos con dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de peso, se observó reducción en colesterol total, lipoproteínas de baja y muy baja densidad.

#### **2.3.6.8. Actividad hepatoprotectora**

Varios autores (Hamza, 2010; Umesha *et al.*, 2013; Abdulrahman *et al.*, 2014) han reportado que moringa tiene propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorias y anti fibróticas en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>), reduciendo el daño hepático y la fibrosis inducida, también redujo los síntomas de la fibrosis hepática y con el extracto hidroetanólico en experimentos por Paliwal *et al.*, (2011), actuó como inductor biofuncional mediante la mejora de antioxidantes, enzimas de la fase I y II con protección contra el daño celular y actuó contra DMBA (Dimetilbenzantraceno) que ocasiona daño en el riñón, y en estudios de quimioterapias se encontró que es seguro usar moringa en dosis de 900 mg/kg de peso corporal (Paliwal *et al.*, 2011). Cabe mencionar que también se ha usado los extractos metanólicos de hojas (250-2000 mg/kg) en epilepsia inducida una disminución significativa en las convulsiones. (Bakre *et al.*, 2013)

#### **2.3.6.9. Actividad hipoglucemiante**

Algunos estudios que se realizaron con las hojas de moringa, indicaron que disminuyeron las concentraciones de glucosa en ratas Goto-Kakizaki (GK) en un experimento agudo con extracto acuoso dentro de las 3 hrs después de la ingestión de alimentos. En estos estudios se hizo la mención de que moringa es una importante fuente de polifenoles, y estos probablemente son los causantes de la reducción de los niveles de glucosa a corto plazo, incluyendo quercetina-3-glucósido, rutina, kaempferol, glucosidos y otros polifenoles (Ndong *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2001).

También, se han realizado experimentos sobre la toxicidad de extractos de Moringa con dosis de; 400, 800, 1600 y hasta 2000 mg/kg de peso vía oral con pruebas hematológicas, bioquímicas y parámetros histológicos en ratas, donde se presentó un ligero cambio en biometría hemática, volumen corpuscular medio, concentración media de hemoglobina, con dosis de 400 mg/kg incrementando los valores y en dosis de 2000 mg/kg reduciéndolos, el estudio concluyó que la planta es relativamente segura tanto en uso nutricional como medicinal (Adedapo *et al.*, 2009). Por otro lado, Asomugha *et al.*, (2005) reportaron estudios de toxicidad con extractos acuosos de hojas de moringa concluyendo que la muerte de animales se dió hasta los

2000 mg/kg y que el consumo excesivo de extracto acuoso de hojas de moringa puede tener ligeros efectos sobre los parámetros sanguíneos en células blancas.

Moringa forma parte del sistema de medicina tradicional en la India, ha sido usada para disminuir las cifras de glucosa. Se tiene conocimiento de que el extracto acuoso concentrado de vainas jóvenes de moringa disminuyen los niveles de glucemia (Jaiswal *et al.*, 2009). Además en la India, en esos estudios se han identificado en vainas jóvenes, hojas frescas y secas, algunos de los posibles compuestos que tienen este efecto tales como; Tiocarbamato N-bencilo, carbamatos N-bencilo, bencilo nitriles y un éster de bencilo aislado a partir de extracto de metanol del polvo seco de la fruta (Edoga *et al.*, 2011; Dhakar *et al.*, 2011; Jaiswal *et al.*, 2013), entre otros compuestos químicos, y se ha demostrado que estimulan significativamente la liberación de insulina de las células beta pancreáticas de roedores (Francis *et al.*, 2004; Jayaraj *et al.*, 2004), lo que deja abierto el campo para seguir con la investigación de estas propiedades farmacológicas de moringa en el tratamiento coadyuvante de la *Diabetes mellitus*. Los estudios realizados sobre el efecto hipoglucemiente son en su mayoría hechos en mediciones agudas y no crónicas, los experimentos de mediciones crónicas han sido con extractos a partir de vainas jóvenes (Jaiswal *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2011).

Las hojas de otras especies como *Moringa stenopetala* se utilizan tradicionalmente en Etiopía para el tratamiento de la *Diabetes mellitus* y ya han sido exploradas por su acción hipoglucemiente (Makonnen *et al.*, 1997).

#### **2.4. Contenido nutrimental de Moringa**

La mayoría de las fuentes revisadas parecen estar de acuerdo sobre los beneficios nutricionales de las hojas de moringa, poseen alto contenido de aminoácidos, vitamina C, complejo B, A, minerales como calcio ( $Ca^{2+}$ ), potasio ( $K^+$ ), rica en alcaloides, ceras, quercetina, zeatina, sitosterol, kaempferol, fenoles ácidos cafeilquínicos. Moringa ha sido usada para tratar la desnutrición proteica, en el Hospital de Walujo Jati desde 2012 en Indonesia (Ferreira *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2011; Guevara 2012; Williams, 2013; Jaiswal *et al.*, 2013, Rizky *et al.* 2013).

Las hojas se utilizan en todo el mundo como un suplemento nutricional ya que contiene significativas cantidades de vitaminas A, vitaminas del complejo B, Hierro y

proteínas, ricos en carotenoides, principalmente,  $\beta$ -caroteno y xantinas (Ferreira *et al.*, 2008), es rica en potasio y fósforo (Jaiswal *et al.*, 2013).

### 2.4.1. Nutrientes

a) Proteínas; en diversos estudios bromatológicos de diferentes países como Cuba, Guatemala, India, Chad, Sri Lanka entre otros, se han reportado entre 21 y 33 % de proteína por 100 g de hoja cruda seca, las hojas contienen todos los aminoácidos esenciales, semejante el contenido en la carne vacuna (Tabla 1) se aprecian 17 aminoácidos, por lo que se considera una proteína completa. Las vainas también tienen proteínas 2.5 g por cada 100 gramos de muestra seca (Alfaro 2008; Pérez *et al.*, 2010; Dhakar *et al.*, 2011; Moyo *et al.*, 2011; Melanie, 2012; Mathur *et al.*, 2014; Liyanage *et al.*, 2014; Leone *et al.*, 2015).

**Tabla 1.** Comparación de aminoácidos entre hojas de moringa y carne de vacuno por cada 100 g.

Aminoácidos	Cantidad (Media) en % por 100 g	
	Moringa pulverizada	Carne magra vacuno
Arginina	1.78	1.54
Serina	1.087	
Ácido Aspártico	1.43	2.4
Ácido Glutámico	2.53	3.97
Glicina	1.53	1.34
Threonina*	1.35	1.13
Alanina	3.03	1.64
Tirosina *	2.65	0.89
Prolina	1.2	1.15
HO-Prolina	0.093	
Metionina*	0.297	0.6
Valina *	1.41	1.31
Fenilalanina *	1.64	1.02
Iso-leucina *	1.17	1.29



<i>Leucina</i> *	1.96	1.89
<i>Histidina</i> *	0.716	0.8
<i>Lisina</i> *	1.63	2.05
<i>Cisteína</i>	0.01	0.28
<i>Triptófano</i> *	0.486	0.3

Fuente: Moyo *et al.*, (2011) y Souci (1994) respetivamente. \*Aminoácidos esenciales.

b) Grasas; los ácidos grasos reportados en diferentes experimentos se han obtenido de; semillas, hoja pulverizada cruda y en extracto metanólico. En México, una casa comercial (Biotesa®) publicó un estudio de grasa en 2012 de hojas secas, los resultados por cada 100 g de muestra fueron; ácido linolénico 49.28 %, ácido linoleico 11.86 %, Acido palmítico 20.28%, ácido oléico 5.67 %, ácido mirístico 5.4 %, ácido miristoléico, 2.16 %, ácido láurico 1.16 %, ácido esteárico 1.84 %, ácido araquídico 0.83 %, ácido behénico 0.734 %, ácido cáprico 0.338 %, ácido palmitoléico 0.139 %, ácido margárico 0.137 % y ácido caproléico 0.043 %.

Los ácidos grasos encontrados en extracto metanólico (Moyo *et al.*, 2011) son ácido  $\alpha$ -linolénico 44.57%, heneicosanoico 14.41%, g-linolénico 0.20%, ácido palmiteico 0.17% y ácido cáprico 0.07%.

Los ácidos grasos de las semillas; acido oléico 73.1 %, palmítico 7.4 %, behénico 5.8 % y esteárico 4%, linolénico 0.19 %, palmitoléico 1.50 %, linoléico 0.95 % entre otros con menor cantidad (Marrero *et al.*, 2014). La semilla contiene de 31-47% de aceite en estudios realizados en Brasil, por Serra *et al.*, (2007) mostraron que el aceite de la semilla seca contiene un 7% de ácido palmítico, 2% de palmitoleico, 4% de esteárico, 78% de oleico, 1% de linoleico, 4% de araquídico, y 4% de behénico.

**Tabla 2.** Cuadro comparativo de análisis de nutrientes de hojas secas de moringa de diferentes países por cada 100 g.

<b>Cenizas</b>	Nd	9.8	10.4	Nd	12.12	Nd	12
<b>Grasa g (soxhlet)</b>	2.3	3.7	4.62	Nd	6.84	7	6.5
<b>Proteína g (nx6,25)</b>	27	21.59	25	33	24.55	21	28.16
<b>Fibra cruda g</b>	19	Nd	23	Nd	5.64	7.5	9.43
<b>Aporte calórico kcal</b>	205	Nd	Nd	Nd	361.56	Nd	300
<b>Cobre mg</b>	0.57	Nd	Nd	Nd	0.57	0.66	1.61
<b>Hierro mg</b>	28.2	Nd	Nd	10.54	28.2	12	28.66
<b>Manganeso mg</b>	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8
<b>Zinc mg</b>	Nd	Nd	Nd	3.3	3.3	2.18	2.72
<b>Potasio mg</b>	1324	259	Nd	1839	1320	Nd	1570
<b>Sodio mg</b>		Nd	Nd	Nd	33,31	252	399.33
<b>Calcio mg</b>	2003	440	Nd	1532	2000	2150	2228
<b>Magnesio mg</b>	368	Nd	Nd	465	368	533	4856
<b>Localidad</b>	Guatemala	Cuba	Colombia	Sri Lanka, Asia Del Sur	Morelos, México	Haití	Chad Y Sahrawi Southwester Algeria, África
<b>Fuente</b>	Alfaro N.C. 2008	A. Pérez <i>et al.</i> , 2010	A. Pérez <i>et al.</i> , 2010	R. Liyanage, <i>et al.</i> , 2014	Biotesa® 2014	Leone A. <i>et al.</i> , 2015	Melanie Broin 2012, Moyo 2014, Leone <i>et al.</i> , 2015,

*Nd no; hay dato.*

- c) Minerales; se ha reportado el contenido de nutrientes de hojas de moringa como; Calcio (3.65%), Fósforo (0.3%), Magnesio (0.5%), Potasio (1.5%), Sodio (0.164%), Azufre (0.63%), Zinc (13.03 mg/kg), Cobre (8.25%), Manganeso (86.8 mg/kg), Hierro (490 mg/kg) y Selenio (363 mg/kg) (Moyo *et. al et al.*, 2011). En la tabla 2, se muestra una comparación de los estudios bromatológicos reportados de diferentes partes del mundo.

Las hojas secas de moringa contienen aproximadamente Vitamina E 77 mg/100 g, beta-caroteno con 18.5 mg/100 g. El contenido de fibra neutrodetergente 11.4%, fibra detergente ácido (FDA) 8.49%, lignina detergente ácido (ADL) 1.8% y celulosa detergente ácido (ADC) 4.01%. El condensado de taninos 3.2%, mientras que los polifenoles totales reportados fue de 2,02% (Moyo *et al.*, 2011).

## 2.5. Desnutrición

“Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana” (FAO, 2011).

La desnutrición es el resultado de diferentes factores individuales, familiares, socioculturales, económicos, ambientales, acceso a atención de salud oportuna y de educación. Alrededor de 795 millones de personas en el mundo no tienen el alimento suficiente para poder tener un estilo de vida saludable, sufren de deficiencia de alimentos la gran mayoría vive en países en desarrollo, donde el 12.9% de ellos presenta desnutrición. En Asia dos terceras partes de su población tiene problemas de hambre, África subsahariana es la región con mayor prevalencia de hambre. La desnutrición es una de las principales causas de muertes en niños menores de 5 años. Existen casi 870 millones de personas en el mundo que sufren de malnutrición crónica representa el 12.5 % de la población mundial (FAO; FIDA ENSANUT 2012; PMA. 2012; Villareal & Ortega 2014).

En América Latina y el Caribe, 49 millones de personas sufren hambre, la FAO señala en su informe de 2012 que en los últimos seis años, solo un millón de personas ha superado el hambre. El hambre a nivel mundial, se debe no a la escasez de alimentos, sino a los recursos insuficientes para adquirirlos y de esta forma asegurar

una alimentación adecuada. La inseguridad alimentaria afecta en mayor medida a las personas en condición de pobreza. El crecimiento agrícola es eficaz para reducir el hambre y la malnutrición (FAO 2012; FIDA 2012; WFP 2012; Villarreal & Ortega 2014).

Se estima que 178 millones de niños menores de cinco años sufren de desnutrición crónica en todo el mundo, el 21% de la población rural infantil y el 11% en zonas urbanas, siendo ésta población la más vulnerable según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT 2012). La prevalencia de anemia en niños de 1 a 4 años en 2006 fue de 23.7%, (casi 1.9 millones de niños), la prevalencia por deficiencia de Hierro a nivel nacional es de 26%, de Zinc 28% siendo una etapa crítica para el crecimiento y el desarrollo (Rivera 2012). Según la Organización Mundial de la Salud 2009 (OMS) el 1% a nivel mundial presenta deficiencia de vitamina A, que es causa de ceguera, de esta cifra, el 8% es en las mujeres embarazadas. El 25% de los niños de 1 a 8 años de edad presentan deficiencia subclínica de vitamina A, según la ENSANUT 2012, el 30% de los niños menores de 2 años de edad y 40% de las mujeres presentan deficiencia de vitamina C en zonas rurales de México (Rosado *et al.*, 1995; Villalpando *et al.*, 2003).

Las hojas de Moringa son una buena fuente de nutrientes, podrían ser una fuente alimenticia en zonas rurales, ya que aporta aminoácidos esenciales para el sano desarrollo y crecimiento de niños que cursan esta etapa (Pérez *et al.*, 2010). Moringa es una alternativa a los suministros de alimentos importados para el tratamiento de la desnutrición en los países pobres (Dhakar *et al.*, 2011).

## **2.6. Diabetes mellitus**

### **2.6.1. Definición**

La *Diabetes mellitus* (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Existen varios tipos diferentes de DM debidos a una compleja interacción entre genética y factores ambientales. Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser deficiencia de la secreción de insulina, decremento del consumo de glucosa o aumento de la producción de ésta. El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos. En Estados Unidos y en México, la DM es la primera causa de; nefropatía en etapa terminal, amputaciones no traumáticas de extremidades

inferiores y ceguera en adultos. También predispone a enfermedades cardiovasculares. Dado que está aumentando su incidencia en todo el mundo, seguirá siendo una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en el futuro próximo (Kasper *et al.* 2015).

### **2.6.2. Clasificación**

La *Diabetes mellitus* se clasifica con base en el proceso patógeno que culmina en hiperglucemia. Existen varios tipos de *Diabetes*, los más frecuentes son DM tipo 1 y DM tipo 2. Los dos tipos de diabetes son antecedidos por una fase de metabolismo anormal de glucosa. La DM tipo 1 es resultado de la deficiencia completa o casi total de insulina y la DM tipo 2 es una enfermedad de etiopatogenia heterogénea y compleja, caracterizada por trastornos en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos como resultado de defectos en la acción de la insulina, también se presentan grados variables de resistencia a la insulina, menor secreción de dicha hormona, mayor producción de glucosa. Las complicaciones isquémicas de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica son la principal causa de morbi-mortalidad en los pacientes diabéticos. La DM tipo 2 es precedida por un período de homeostasia anormal de la glucosa clasificado como trastorno de la glucosa en ayunas (*impaired fasting glucose*, IFG) o trastorno de la tolerancia a la glucosa (*impaired glucose tolerance*, IGT) (Leiva *et al.*, 2010; Kasper *et al.*, 2015).

Existen otros tipos de diabetes, las causas son defectos genéticos específicos de la secreción o acción de la insulina, alteraciones metabólicas, trastornos mitocondriales y un sinnúmero de situaciones que alteran la tolerancia a la glucosa. La DM puede ser el resultado de enfermedad del páncreas exocrino cuando se destruye gran parte de los islotes pancreáticos. Esta destrucción de estos islotes se ha atribuido a infecciones víricas, pero son causas muy raras. Las dislipidemias que se presentan secundarias a la enfermedad se asocian a alteraciones en la estructura, composición y funcionalidad de las lipoproteínas plasmáticas, presentándose un perfil lipídico proaterogénico (Kasper *et al.*, 2015).

### **2.6.3 Diagnóstico**

El *National Diabetes Data Group* y la Organización Mundial de la Salud han propuesto criterios diagnósticos para la DM basados en lo siguiente: 1) el espectro de la glucosa plasmática en ayunas (*fasting plasma glucose*, FPG) y la reacción a una carga oral de glucosa (prueba de tolerancia de glucosa ingerida (*oral glucose tolerance*

test, OGTT) varían entre los individuos normales, y 2) la DM se define como nivel de glucemia al que ocurren las complicaciones específicas de la *Diabetes* más que como desviaciones a partir de una media basada en la población.

La tolerancia a la glucosa se clasifica en tres categorías, con base en la cifra de glucosa plasmática en el ayuno (FPG)

- 1) FPG <5.6 mmol/L (100 mg/100 mL) es la cifra normal;
- 2) FPG = 5.6 a 6.9 mmol/L (100 a 125 mg/100 mL) se define como pre-*Diabetes*, es decir, alteración de la glucemia en el ayuno.
- 3) FPG >7.0 mmol/L (mayores a 126 mg/100 mL) justifica el diagnóstico de *Diabetes mellitus*.

Con base en los datos de la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) se define Intolerancia a la glucosa con niveles de glicemia en ayunas entre 7.8 y 11.1 mmol/L (140 y 199 mg/100 mi) y se define la *Diabetes* como la cifra de glucosa mayor de 11.1 mmol/L (200 mg/100 mi) 2 h después de la ingestión de 75 g de glucosa, como estímulo. Los criterios actuales de diagnóstico de la DM resaltan que el análisis espectral de glucosa en ayunas es el método más fiable y cómodo de diagnóstico de DM en pacientes asintomáticos. Una concentración de glucosa plasmática >11.1 mmol/L (200 mg/100 mi) tomada al azar y acompañada de los síntomas clásicos de DM (poliuria, polidipsia y polifagia, además pérdida de peso) basta para el diagnóstico de DM. Se sugiere realizar la prueba de sobrecarga oral de glucosa, y la determinación de hemoglobina glicosilada (Hb A1C) como conjunto de pruebas diagnósticas (Kasper *et al.*, 2015).

#### **2.6.4. Complicaciones**

Según la adherencia del paciente al tratamiento, tanto farmacológico como higiénico dietético, pueden o no presentarse complicaciones, como la cetoacidosis y el estado de hiperglucemia hiperosmolar. En la cetoacidosis, la glucosa es sustituida por grasa como fuente de energía, se descomponen cuerpos cetónicos que se acumulan en la sangre y orina; a niveles altos, estos ácidos son tóxicos. Se produce además una hiperglucemia, con valores de glucosa plasmática superiores a los 300 mg/dL, debido a que la falta de insulina provoca acumulación de glucosa plasmática (ADA, AMD 2015).

El estado hiperosmolar hiperglicémico, es un estado en el que el paciente presenta una excesiva hiperglicemia, además de una marcada hiperosmolaridad. Esto se debe



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a una baja en la utilización por parte del músculo y esto inicia mecanismos como glucogénesis y glucogenólisis.

Otras complicaciones de un mal manejo de la enfermedad a largo plazo pueden ser las complicaciones vasculares y no vasculares. Las complicaciones vasculares se subdividen en microangiopatía (retinopatía, neuropatía, nefropatía, glaucoma y cataratas) y macroangiopatía (coronariopatía (*coronary artery disease*, CAD), enfermedad vascular periférica (*peripheral arterial disease*, PAD) y enfermedad vascular cerebral, hipertensión arterial, enfermedad arterial periférica, insuficiencia renal y las complicaciones no vasculares comprenden problemas como gastroparesia, infecciones y afecciones de la piel, digestión lenta de los alimentos, disfunción eréctil y síndrome del túnel carpiano, entre otras. La *Diabetes* de larga duración puede acompañarse de hipoacusia, retinopatías, cataratas, glaucoma, nefropatía, problemas cardíacos, eventos cerebrovasculares problemas nerviosos (como depresión o ansiedad), problemas en el sistema de coagulación y lípidos (Kasper *et al.*, 2015; Hernández, 2013).

El riesgo de complicaciones crónicas aumenta con la duración de la hiperglucemia; suelen hacerse evidentes en el transcurso del segundo decenio de la hiperglucemia. Como la DM de tipo 2 puede tener un periodo prolongado de hiperglucemia asintomática, muchos individuos con DM de tipo 2 presentan complicaciones en el momento del diagnóstico. Las complicaciones microangiopáticas de la DM son el resultado de la hiperglucemia crónica.

La dislipidemia es el resultado de la disminución en la oxidación de glucosa y la reducción de su depósito como glucógeno, aunado al incremento de la producción hepática de glucógeno. Una de las complicaciones como la nefropatía diabética (ND) revelan la hipertrofia glomerular y de elementos tubulares; aumento en el grosor de las membranas basales glomerulares, la acumulación progresiva de los componentes de la matriz extracelular, aumento temprano en la tasa de filtración glomerular con la hipertensión intraglomerular, proteinuria posteriores, hipertensión sistémica y eventual pérdida de funcional renal (Abdulrahman *et al.*, 2014).

### **2.6.5. Factores de predisposición**

Los factores de riesgo más comunes asociados a esta enfermedad son la obesidad y/o sobrepeso Obesidad (IMC;  $>25 \text{ kg/m}^2$ ), sedentarismo, tabaquismo, alto consumo de carbohidratos y grasas saturadas, edad, trastorno de tolerancia a la glucosa,

antecedentes de *Diabetes mellitus* Gestacional o peso al nacer mayor a 4 kg, Hipertensión (presión arterial (>140/90 mmHg), Concentración de colesterol de HDL <35 mg/100 mL (0.90 mmol/L), concentración de triglicéridos >250 mg/100 mL (2.82 mmol/L), síndrome de ovario poliquístico, acantosis nigricans, antecedentes de enfermedad vascular, antecedentes familiares de *Diabetes* (p. ej., padres o hermanos con *Diabetes*) y tipo de raza (p. ej., afroestadounidense, hispanoestadounidense, amerindio, ascendencia asiática, isleño del Pacífico), los latinos tienen una prevalencia mayor del 10 %, según estudios realizados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC 2013; Kasper *et al.*, 2015).

### **2.6.6. Prevalencia y Epidemiología**

La DM es una enfermedad crónico metabólica, asociada al desarrollo de complicaciones afectación de la calidad de vida del paciente si el tratamiento es inadecuado (García *et al.*, 2009). Según datos de la OMS en 2010, 285, millones de personas en el mundo sufrían de *Diabetes mellitus*, en 2012, 347 millones de personas y según estimaciones en el año 2030, 438 millones de personas presentarán la enfermedad. En México, 6.4 millones de personas han sido diagnosticados con DM según la ESANUT en 2012, el 9.2% de la población Mexicana la presentaba y en 2006 fue de 7.3% y en el año 2000 fue de 4.6% lo que indica que la prevalencia va en aumento. Más del 70% de las personas con DM viven en países de ingresos bajos y medios. Ésta enfermedad representa, una las primeras causas de muerte en México (ENSANUT 2012).

En Norteamérica, incluyendo Puerto Rico y México, la cifra actual de personas con esta enfermedad es de 37 millones. En Centroamérica, el resto de El Caribe, centro y Sudamérica, se estima que existen que 24 millones de personas con la enfermedad. A nivel mundial destacan China, con 98.4 y la India con 65.1 millones. Se estima que en el año 2035 América Central y América del Sur sufrirán un incremento del 60% (38.5 millones). Europa se proyecta con el menor aumento: 22%. A su vez, los porcentajes de personas fallecidas por esta enfermedad fueron del 38% en Norteamérica y del 44% en centro y Suramérica, y la cifra mayor 76%, al continente Africano. En casi todos los países, la gran mayoría de diabéticos reside en zonas urbanas, la DM tipo 2 se ha convertido en uno de los más graves problemas sanitarios de nuestro tiempo. De acuerdo con la Federación Internacional de *Diabetes*, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México (en ese orden) son los países con mayor número de personas con DM. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos



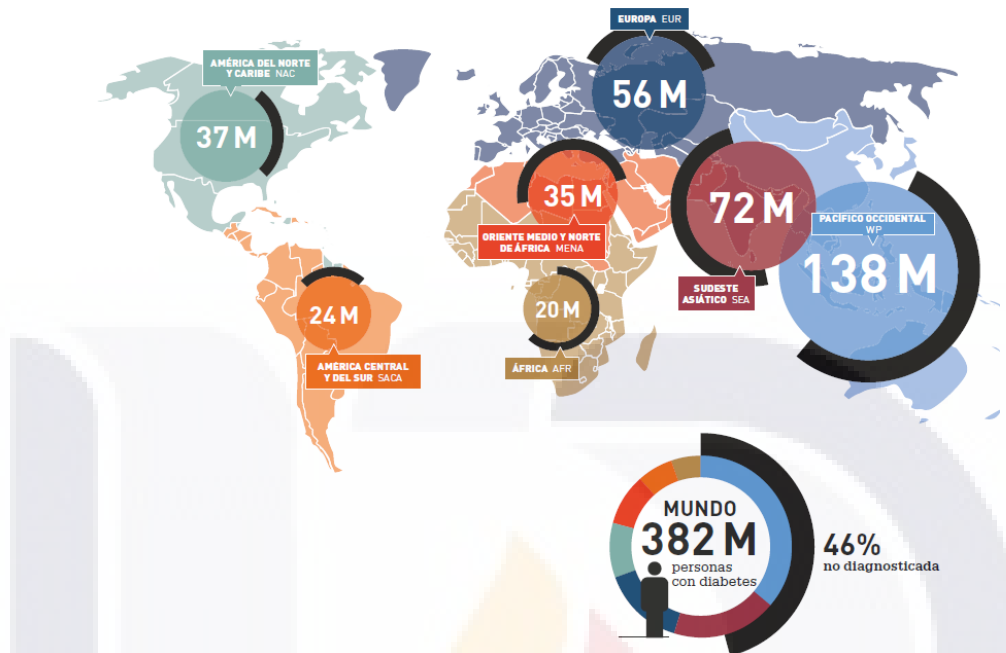
con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Valdés *et al.*, 2007; Arredondo 2012; Hernández *et al.*, 2013; Mora-Morales, 2014).

Es de una necesidad emergente generar una respuesta en políticas públicas para su prevención y control. En México, representa entre 5 y 14% del gasto de salud total en su atención y complicaciones de los casos tratados de la población (Leiva *et al.*, 2010, Arredondo *et al.*, 2012, Valdés *et al.*, 2007; Hernández-Ávila *et al.*, 2013). En el país, la edad promedio de las personas que murieron por *diabetes* en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años. Algunas estimaciones indican que, por ejemplo, Estados Unidos desde 1997 destina más de 15% del gasto en salud en la atención de los diabéticos (Hernández *et al.*, 2013; Arredondo 2012).

Varios intentos se han hecho para tratar y controlar esta enfermedad. Varios agentes quimioterapéuticos, cambios de estilo de vida, se han explorado en el pasado (Abdulrahman *et al.*, 2014). Se han lanzado nuevos programas públicos para tratar esta enfermedad de manera más integral. Se ha demostrado que el estilo de vida (incluyendo la alimentación) favorecen y reducen drásticamente las complicaciones, sin embargo, la búsqueda de nuevos fármacos con menor impacto en órganos y sistemas implicados en la *Diabetes* sigue en pie, debido a la alta tasa de mortalidad y el número de personas que cada año asciende a nivel mundial. Los estilos de vida poco saludables, son frecuentemente tanto en niños, adolescentes y adultos en la población mexicana, quienes han ocasionado un aumento agigantado en la prevalencia de obesidad y sobrepeso que va creciendo cada año. La obesidad es el principal factor de riesgo modificable de la *Diabetes*. Las estrategias de prevención y cambio de hábitos y estilo de vida (incluyendo la eliminación de los factores de riesgo) son altamente efectivos para reducir el riesgo de presentarla o la aparición de la DM, México tiene condiciones de alto riesgo, por lo que recientemente se han impulsado políticas intersectoriales relacionadas con la salud alimentaria y con ello combatir uno de los más importantes factores de riesgo, la obesidad (Hernández-Ávila *et al.*, 2013).

A pesar de las estrategias, las indicaciones para la modificación de hábitos higiénicos dietéticos, los pacientes parecen no modificarlos y continúan presentando dislipidemias. En un estudio de Framingham (año de publicación) se observó que el 13% de los hombres y el 24% de las mujeres con DM tenían dislipideamia. El uso de plantas medicinales para el tratamiento de la *Diabetes mellitus* está aumentando ahora, sobre todo en los países en desarrollo. Se está convirtiendo en una

preocupación para entender los efectos del uso de las hierbas medicinales para el control de diversas enfermedades, como la *Diabetes mellitus*.



**Figura 3.** Prevalencia de Diabetes mellitus en el mundo. ATLAS de la DIABETES de la Federación Internacional de Diabetes 2013.

### 2.6.7. Páncreas

Es una glándula digestiva accesoria alargada de derecha a izquierda y de abajo hacia arriba, angosta en sentido anteroposterior, con una concavidad posterior moldeada sobre la columna lumbar. El páncreas tiene dos tipos de secreción; exocrina y endócrina.

El páncreas contiene tejido exócrino conformado por células acinares que producen enzimas para la digestión de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, se vacía en el duodeno a través de los conductos pancreáticos principal de Wirsung y accesorio de Santorini y compuesto también por la secreción endócrina que compone las hormonas insulina y glucagón, las células de los islotes de Langerhans que son hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa. Varios factores regulan la secreción exocrina del páncreas, como las respuestas neurológicas y hormonales, la presencia de alimentos y la composición de ellos. Los dos estímulos hormonales principales de la secreción pancreática son secretina y colecistocinina. Las fases en la que las secreciones influyen son; fase cefálica que está regulada por el nervio vago y se activa al estimular los sentidos, como ver, oler, saborear, a su vez

ésta induce la secreción de bicarbonato y enzimas pancreáticas, otra fase es la distensión del estómago a la llegada de los alimentos se estimula la fase gástrica de la secreción pancreática, la cual incluye la estimulación de la secreción de enzimas, y por último la fase intestinal, que está mediada por la colecistoquinina. Diariamente el páncreas produce alrededor de 1200 ml de líquido rico en bicarbonato y enzimas digestivas, entre 40-50 células acinares forman un acino seroso que contienen tres células centroacinares y dan inicio al sistema de conductos pancreáticos y el cual forman el páncreas exocrino. Las células acinares tienen forma piramidal y la base descansa en la lámina basal, el núcleo es redondo y basófilo. El sistema de conductos pancreáticos inicia a nivel del acino seroso formado por células centroacinares y células cúbicas pálidas, al agruparse forman los conductos que darán origen a los conductos interlobulillares de Wirsung, que se unen al colédoco antes de desembocar en el duodeno en la papila de Vater (Arenas *et al.*, 2005; Mahan *et al.*, 2013; Olvera *et al.*, 2008; Kasper *et al.*, 2015).

El páncreas endócrino y su componente principal, los islotes de Langerhans, están formados por un conglomerado esférico de aproximadamente 3000 células, el páncreas en total está constituido por 100 islotes, solo el 1% del tejido total son islotes, con mayor proporción de islotes en la cola del órgano. La región endócrina está formada por 5 tipos de células, beta, alfa, gamma, células G, y células P.P. Las células alfa, son productoras de glucagón, éste actúa en los hepatocitos activando enzimas glucogenolíticas. Células beta, productoras de insulina, la insulina es liberada al espacio extracelular cuando se incrementa la glucemia después de una comida rica en carbohidratos. Células G.- producen gastrina, hormona estimuladora de la secreción del (HCl) ácido clorhídrico, el vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal. Células P.P. Polipéptido pancreático, éstas células producen polipéptido pancreático, su función es autorregular la función secretora, también ejerce efectos sobre el glucógeno hepático y las secreciones gastrointestinales, la concentración de los polipéptidos pancreáticos se ven incrementadas posterior a las ingestas de alimentos, ayunos y actividad física (Arenas *et al.*, 2005; Mahan *et al.*, 2013; Olvera *et al.*, 2008; Kasper *et al.*, 2015)

### **2.6.7. Insulina**

Fue descubierta en 1921, por Frederick Grant Banting, Charles Best, James Collip, y J.J.R. Macleod de la Universidad de Toronto, Canadá. Es una hormona polipeptídica conformada por 51 aminoácidos su nombre proviene del latín *insula*

“isla”, es la principal responsable del control del metabolismo de la glucosa, la insulina es producida en las células beta de los islotes de Langerhans, se sintetiza como un polipéptido precursor de una única cadena de 86 aminoácidos de 12 kDa. La pre-propinsulina, elimina el amino terminal generando la proinsulina. La escisión de un fragmento interno de la cadena de 31 residuos genera el péptido C y las cadenas A (21 aa) y cadena B (30 aa) de la insulina unida por puentes disulfuro, insulina y péptido C se almacenan juntos. Con la estimulación las células islote liberan de forma equimolar cantidades de insulina y péptido-C, pequeñas cantidades de proinsulina y otras intermedias. El péptido C es menos sensible a la degradación hepática que la misma insulina, éste es un buen marcador para la medición de la concentración de la insulina. Las células beta secretan un polipéptido de amiloide insular (IAPP), constituye un elemento principal de las fibrillas del amiloide que parecen en los islotes de pacientes que sufren de *Diabetes mellitus*. Actualmente la molécula insulina forma parte de tratamientos farmacológicos, se producen por tecnología de ADN recombinante. La insulina tiene importantes funciones como la regulación metabólica: inhibe la glucogenólisis, estimula la gluconeogénesis, aumenta el transporte de glucosa en tejido muscular y tejido adiposo, estimula la glucólisis, estimula la síntesis de triglicéridos y proteínas, disminuye la secreción hepática, aumenta la recaptación de aminoácidos y de potasio (Arenas *et al.*, 2005; Olvera *et al.*, 2008; Mahan *et al.*, 2013; Kasper *et al.*, 2015).

### **2.6.8. Tratamientos para *Diabetes Mellitus***

### **2.6.9. Tratamientos Alópatas**

Alopatía es el término utilizado para describir a la medicina convencional, etimológicamente proviene del alemán *allopathie*, y éste de las raíces griegas (alos) (otro, contrario, ó distinto), y (patos) (sufrimiento). La alopatía usa de un medicamento contrario al síntoma de la enfermedad. La opción de medicamentos alópatas que tienen los pacientes en su control de Diabetes incluyen la insulina y varios agentes antidiabéticos orales, las cuales son utilizadas como monoterapia o en combinación para lograr mejorar la regulación glucémica, muchos de los fármacos de esta índole tienen efectos adversos y en la *Diabetes* crónica pueden perder su efectividad (García *et al.*, 2009). El tratamiento incluye insulina y los antidiabéticos orales que se dividen en grupos como las sulfonilureas, meglitinidas, inhibidores de la alfa glucosidasa, la exenatida, los inhibidores de la dipeptidil-peptidasa-4 (DPP-4) y las glitazonas. Estos

medicamentos tienen el poder de causar varios efectos tóxicos específicos además de la hipoglucemia (Escorcía 2009).

### **2.6.10. Sulfonilureas**

Se comenzaron a utilizar hace más de 50 años, son derivados de las sulfamidas, son ácidos débiles que se unen a las proteínas que son metabolizadas por el hígado, se excretadas en la orina por el riñón o por las heces. Éstas aumentan la liberación de insulina a través de un canal de potasio ATP dependiente, y pueden disminuir la resistencia periférica a la insulina. Por un lado actúan sobre las células beta, induciendo la secreción de insulina, basal como por la ingesta, es por esto que las células beta deben ser funcionales, así como mejora la captación y utilización de glucosa en otros tejidos (Mateos & Zacarías 2002; Alcázar *et al.*, 2006)

Todas las sulfonilureas están relacionadas con ganancia de peso, los agentes de primera generación son: Tolbutamida, acetohexamida, tolazamida y cloropropamida. Los agentes de segunda generación como: glibenclamida, gliclazida, glipizida, y glimepirida, no se unen iónicamente a proteínas, y es menos probable que interaccionen con otros fármacos. Las sulfonilureas reducen la glucosa plasmática de ayuno de 50-70 mg/dL y la HbA1c 0.8-1.7% (Mateos & Zacarías 2002).

Los efectos secundarios son la hipoglicemia, náuseas, vómitos, hiperacidez gástrica, dolor epigástrico, anorexia, diarrea, disgeusia, cefaleas, mareos y parestesias, (Alcázar *et al.*, 2006), complicaciones hematológicas como anemia hemolítica. Pocas alteraciones gastrointestinales como dispepsia, náusea. La cloropropamida es la única que produce hiponatremia y retención de líquidos (Mateos & Zacarías, 2002).

### **2.6.11. Biguanidas**

Son compuestos con 2 moléculas de guanidina como; buformin, fenformin y metformin. La metformina se introdujo en 1995 en Estados Unidos para pacientes con DM-2, después de haber sido usada en Europa (Alcázar *et al.*, 2006). La metformina no tiene riesgo de producción de acidosis láctica que tienen otras biguanidas, es eliminado únicamente por riñón, tiene una vida media corta de 2-4 hrs, con menos afinidad hacia las membranas biológicas. Reduce la absorción de glucosa a nivel gastrointestinal, inhibe la gluconeogénesis, estimula la captación celular de glucosa en tejido muscular estimula la síntesis de glucógeno, incrementa la unión de insulinareceptor e incrementa los transportadores GLUT 1 y GLUT 4 y aumentan su concentración en varios tejidos. Metformina reduce los niveles de lípidos, colesterol



sérico, LDL, triglicéridos y VLDL. Reduce la glucemia en ayunas de 50-70 mg/dl y la HbA1c entre un 1.4 y un 1.8%. La metformina está indicada como monoterapia, aunque se puede utilizar en combinación con los secretagogos de insulina, inhibidores de la alfa-glucosidasa, tiazolidindionas o insulina. Los efectos adversos son a nivel gastrointestinal e incluyen anorexia, náusea, vómito, malestar abdominal, diarrea y dejan un sabor metálico en la boca, así como anemia macrocítica. Esta sintomatología es transitoria, también se recomienda precaución al administrar fármacos que antagonizan la secreción de insulina o su acción ( $\beta$ -bloqueadores, corticoides, diuréticos, antagonistas del calcio) (Mateos & Zacarías 2002; Alcázar *et al.*, 2006; Escorcía 2009; Surya *et al.*, 2014).

### **2.6.12. Inhibidores Alfa-Glucosidasa**

La oscilación glucémica postprandial favorece al desarrollo de complicaciones específicas como la neuropatía, retinopatía, problemas cardiovasculares. Reducen la glucemia en ayunas de 35-40 mg/dl y la HbA1c entre un 0.4 y un 0.7%. Los inhibidores de alfa-glucosidasa son: acarbosa, miglitol y voglibose. Estos fármacos, inhibiendo los enzimas del borde en cepillo del enterocito que hidrolizan los carbohidratos complejos que posteriormente son absorbidos, después de una comida, disminuyendo la hiperglucemia postprandial, retrasan la digestión de carbohidratos, cambiando la absorción a las porciones más distales del intestino delgado y colon, retardan la entrada de la glucosa a la circulación sistémica, dando mayor tiempo de la célula beta para incrementar la secreción de insulina como respuesta al pico de glucosa plasmática. Estos medicamentos son más usados en pacientes con DM-2 que inician una terapia. Los principales efectos secundarios se producen a nivel gastrointestinal; dolor abdominal, flatulencias y diarrea (Alfaro *et al.*, 2000; Alcázar *et al.*, 2006).

### **2.6.13. Meglitinidas**

La repaglinida y nateglinida están indicadas en DM para el control de picos postprandiales de hiperglucemia. La repaglinida se elimina principalmente por la bilis, y el otro medicamento tiene un metabolismo hepático (Alfaro *et al.*, 2000).

La terapia que modifica la glucosa postprandial es más efectiva en reducir la HbA1c que la glucosa plasmática. Las meglitinidas actúan a través del cierre del canal ATP sensible en la membrana de la célula beta, uniéndose a receptores distintos de las sulfonilureas (SUR1/KIR 6.2). Estos fármacos restauran la primera fase de secreción de insulina disminuyendo la hiperglicemia postprandial, sin pico hiperglicémico entre las comidas. El efecto insulínico de la nateglinida ocurre dentro de 15 min y su

duración es de 4 hrs. Nateglinida está indicada como un tratamiento adjunto a la dieta y ejercicio en diabéticos tipo 2 (Mateos & Zacarías 2002; Escorcía 2009; Surya *et al.*, 2014).

#### **2.6.14. Tiazolidinedionas**

También son llamadas glitazonas o sensibilizadores de insulina; actúan a nivel muscular y hepático, disminuyendo la resistencia a la insulina, aumentan la sensibilidad a la insulina, sin afectar su secreción y disminuyen la producción hepática de glucosa. Su mecanismo de acción es promover la captación de glucosa en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado a través de los receptores celulares nucleares conocidos como receptores gamma proliferador activado del peroxisoma, generan un aumento de la captación de glucosa y en las proteínas transportadoras GLUT-1 y GLUT-4. En tejido adiposo estimulan el transporte de glucosa basal, en el hígado las tiazolidinedionas aumentan la sensibilidad a la insulina. Son metabolizadas por el hígado. Tienen efectos en el metabolismo de los lípidos con las lipoproteínas de alta densidad. Los efectos secundarios son escasos, pero incluyen ganancia de peso, retención de líquidos, hemodilución, sinusitis, infección del tracto respiratorio, faringitis, cefalea, anemia dilucional y usualmente no son severos (Alfaro *et al.*, 2000; Alcázar *et al.*, 2006).

#### **2.6.15. Terapia con insulina en diabetes tipo 2**

La insulina es necesaria para el metabolismo normal de carbohidratos, proteínas y grasas. Los pacientes con *Diabetes mellitus* tipo 1 requieren necesariamente para vivir de la administración de insulina, a diferencia del paciente con *Diabetes* tipo 2, sin embargo, con el paso del tiempo muchos de estos pacientes disminuirán su producción de insulina, siendo necesaria la administración exógena de insulina para un buen control glucémico, así como los pacientes con Diabetes gestacional o aquéllos con Diabetes asociada a otras condiciones especiales o enfermedades (trastornos del páncreas exócrino, uso de esteroides, endocrinopatía, etc) (Mateos & Zacarías 2002; Escorcía 2009).

Por lo tanto la terapia con insulina debe iniciarse en los siguientes casos:

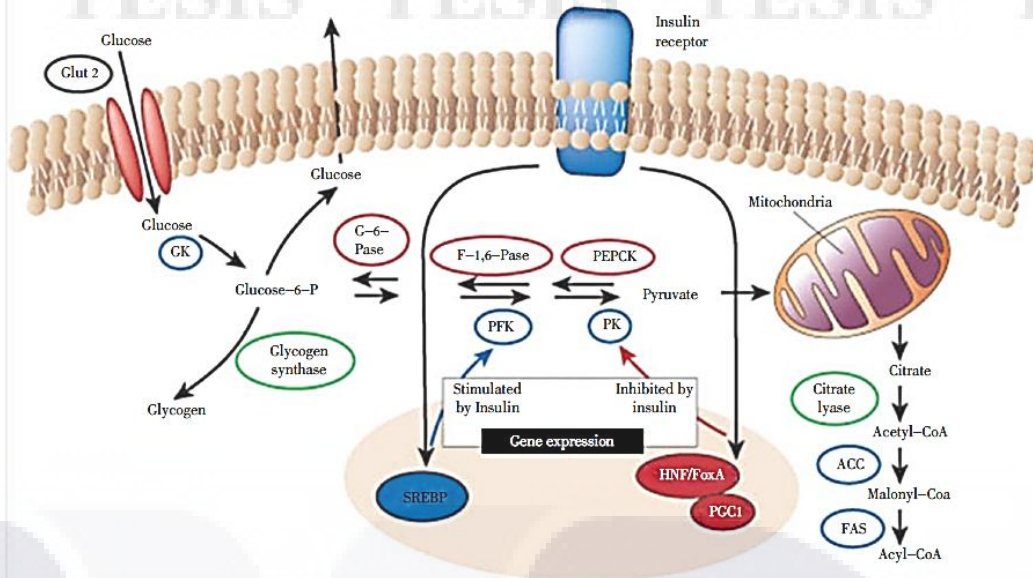
1. Cualquier paciente con Diabetes tipo 2 con marcada hiperglicemia (280-300mg/dL), y cetonuria o cetonemia.
2. Pacientes sintomáticos con Diabetes tipo 2 con hiperglicemia de ayuno (280-300mg/dL) importante.



3. Cualquier paciente con Diabetes tipo 2 quien después de haberle explicado las opciones de tratamiento desea recibir insulina como terapia inicial.
4. Mujeres con Diabetes gestacional quienes no se han controlado, sólo con dieta. (Mateos & Zacarías 2002; Escorcía 2009)

#### **2.6.16. Inhibidores de DPP-4.**

La Sitagliptina es una serinoproteasa, actúa evitando la degradación de las incretinas, que son hormonas intestinales encargadas de la regulación de la glucosa, es inhibidor de la enzima, cuando estas se ven inhibidas incrementa la concentración de los GLP-1 y GIP (Glucagon Like Peptide-1 o GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (Glucose-dependent insulintropic peptide o GIP), la actividad de las incretinas está limitada por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4). Las incretinas GLP-1 y GIP, son liberadas por el intestino a lo largo del día y sus niveles aumentan en respuesta a las comidas. Si las concentraciones de glucosa son normales o elevadas, el GLP-1 y el GIP aumentan la síntesis y liberación de insulina de las células beta pancreáticas; además, el GLP-1 reduce la secreción de glucagón de las células alfa pancreáticas. La actividad del GLP-1 y del GIP está limitada por la enzima DPP-4. Las incretinas tienen efectos benéficos en el control glucémico a través de efectos pancreáticos y extrapancreáticos. La sitagliptina se metaboliza en el riñón y es excretada por la orina. La DPP-4 pertenece a una amplia familia de peptidasas, con diversas funciones como la DPP-8, DPP-9, la proteína de activación de fibroblastos (FAP), QPP (Quiescent Cell Proline Peptidase), la aminopeptidasa P y la prolidasa. Algunos estudios indican que sitagliptina aumenta el colesterol plasmático total, predominantemente transportado en HDL, y disminuye el transporte reverso de colesterol y su excreción fecal. Este medicamento probablemente tiene mejor funcionalidad en la combinación con otros agentes como metformina, glitazonas, sulfonilureas e insulina (Girolamo *et al.*, 2008 Leiva *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de la Insulina (Surya *et al.*, 2014).

### 2.6.17. Diabetes Experimental

El uso de agentes químicos para causar Diabetes experimental permite realizar estudios detallados de estudios bioquímicos y morfológicos que ocurren después de la inducción. Para reproducir esta enfermedad se han logrado diferentes técnicas experimentales, en 1889 von Mering y Minkowski, desarrollaron Diabetes experimental en perros por medio de una pancreatectomía y desde entonces ha sido un método muy usado para desarrollar Diabetes experimental, pero existen otro métodos no quirúrgicos como en el caso de los métodos por inducción química, son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células beta del páncreas y ocasionan un estado de deficiencia de insulina, otro grupo de sustancias actúan sobre éstas células pero no las destruyen, los fármacos más usados son Estreptozotocina y Aloxana. Otra clase de sustancias incrementan los requerimientos endógenos de insulina, debilitan el páncreas y de esta forma causan diabetes, de este grupo son las hormonas antagonistas de la insulina, anticuerpos anti-insulina y agentes quelantes como el Zn (Ramos 1994). 1

### 2.6.18. Estreptozotocina

STZ [2-deoxy -2-(3-methy-3-nitrosourea) 1-D-glucopyranose] es un antibiótico extraído de *Streptomyces achromogenes* que posee propiedades antitumorales y oncogénicas. El primero en detectar la respuesta diabétogénica fue por los laboratorios Upjohn durante una prueba de poderosos antibióticos de éste organismo. Sin embargo, Rakieten *et al.*(1963) fueron los primeros en describir la necrosis de las

células betas y el consiguiente estado que podían tener los perros y ratas con una sola dosis intravenosa (McNeill 1999).

La estreptozotocina (STZ) es un agente diabetogénico ampliamente usado para la producción de *Diabetes* experimental, es una sustancia selectiva y rápida con acción citotóxica para las células beta de los islotes de Langerhans, en ciertas especies causa Diabetes de forma permanente, causa daño desde la primera hora de su administración, algunas evidencias indican su toxicidad provoca una reducción en los niveles de dinucleotido de nicotinamida y adenina (NAD) (Rosales, 1994; Ramos 1994)

Después de la administración de STZ la glucosa en sangre presenta una respuesta que se divide en etapas, a las 2 hrs de la inducción, los valores de glucosa se incrementa, posterior a 10 hrs las cifras baja, y posteriormente a las 24 hrs incrementan drásticamente, ocasionando así una glicemia permanente. La duración y la severidad de la Diabetes está marcado por las dosis empleadas, las dosis muy altas acaban por terminar la vida del animal días después de la inyección. Un factor a considerar para la inducción es la susceptibilidad, la especie que se le va a inducir y la edad del animal, así como el sexo. A menor edad, tienen mayor sensibilidad los animales.

El mecanismo de acción no es claro, pero se han propuesto tres posibles procesos;

- 1.- Metilación del ADN dado y la STZ funciona como donador del óxido nítrico en los islotes pancreáticos ocasionando la necrosis de las células  $\beta$ .
- 2.- Destrucción autoinmune de las células  $\beta$ .
- 3.- Inhibición de la enzima N-acetil-beta-D-Glucosaminidasa que cataliza la ruptura de N-acetilglucosamina unida a una proteína de 135 kDa enlazada por un  $O_2$  (Rosales, 1994; Ramos 1994; McNeill *et al.*, 1999).

### **2.6.19. Carboximetilcelulosa**

Es un derivado de la celulosa constiituyen los polímeros más usados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, por sus propiedades puede formar películas, de carácter hidrofílico genera viscosidad es inocuo, espesante y su comportamiento como solución coloidal, se convierte en un buen vehículo de medicamentos, además no genera toxicidad es altamente biodegradable y tiene biocompatibilidad dependiendo el grado de pureza (Luna 2011).

## 2.7. Tratamientos con plantas medicinales

Por otro lado, el control con plantas medicinales hace a más de 400 tratamientos naturales con plantas para la *Diabetes mellitus* que han sido registrados, pero solo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia (García *et al.*, 2009). A pesar de ello, los remedios con plantas, permanecen como tratamientos principales en países subdesarrollados (Bailey, 2005). Cada día se presta más atención al uso de las plantas medicinales de forma que la Etnobotánica, la Fitoterapia y la Fitoquímica están tomando un auge inesperado, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico. El 80% de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal según lo señala la OMS (García *et al.*, 2009).

Más de 350 plantas medicinales han sido usadas en el tratamiento de DM, pero solo un pequeño número de estas se ha investigado su efectividad. Sin embargo, los remedios caseros de plantas son el tratamiento principal en zonas semidesarrolladas. Entre las plantas que se han usado como tratamiento de esta enfermedad están, *Acacia arabica*, *Aloe vera*, *Alpina calcarata*, *Allium sativum L.*, *Asparagus racemosus*, *Annona squamosa*, *Bambusa vulgaris*, *Brassica hispida*, *Capsicum annum*, *Cnetella asitica*, *Eugenia jambolana*, *Grewia asiática*, *Misosa púdica*, *Moringa oleífera*, *Terminalia catappa*, *Tragia invoucrate* entre otras que menciona Surya en sus investigaciones (Surya *et al.*, 2014).

## 2.8. Cultivo De Tejidos Vegetales (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales, *in vitro* es una herramienta de la biotecnología vegetal que incluye muchas técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar, material vegetal en condiciones controladas y asépticas. Para el cultivo de tejidos vegetales se utiliza cualquier región de la planta, pudiendo ser semilla, ápices axiales, axilares, segmentos internodales, hojas (Roca & Mroginski 1993; Esquivel & Escalant 1994).

Las ventajas que ofrece la micropropagación con respecto a los métodos convencionales:

- a) Se mantienen todas las características genotípicas del material inicial seleccionado.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- b) Debido a que se realiza en el laboratorio, es libre de contaminantes e independiente de las condiciones externas no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas, etc.
  - c) El número de plantas que se puede obtener mediante micropropagación es por su naturaleza prácticamente ilimitado.
  - d) El espacio que se requiere es mínimo
  - e) Las plantas que se obtienen están libres de microorganismos contaminantes como bacterias, hongos, etc.
  - f) Obtención de metabolitos secundarios
  - g) Mejora genética de plantas.
  - h) Conservación de germoplasma
  - i) Germinación de semillas.

La reproducción de plantas asexual por el cultivo de tejidos vegetales se debe a que todas células de un organismo poseen la capacidad para permitir el crecimiento y el desarrollo de nuevos individuos completos, a esta capacidad se llama totipotencialidad celular, y es característica de células meristemáticas presentes en diferentes partes de la planta. La potencialidad de una célula diferenciada para generar tejidos nuevos o bien un organismo completo va a disminuir según el grado de diferenciación alcanzado por la célula. Cuando una parte de tejido de la planta crece en un medio con condiciones asépticas y con hormonas vegetales (va a depender de las hormonas) se puede desarrollar tejido calloso, que es un crecimiento tumoral puede dar una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente los órganos o también llamada organogénesis (Roca & Mroginski 1993).

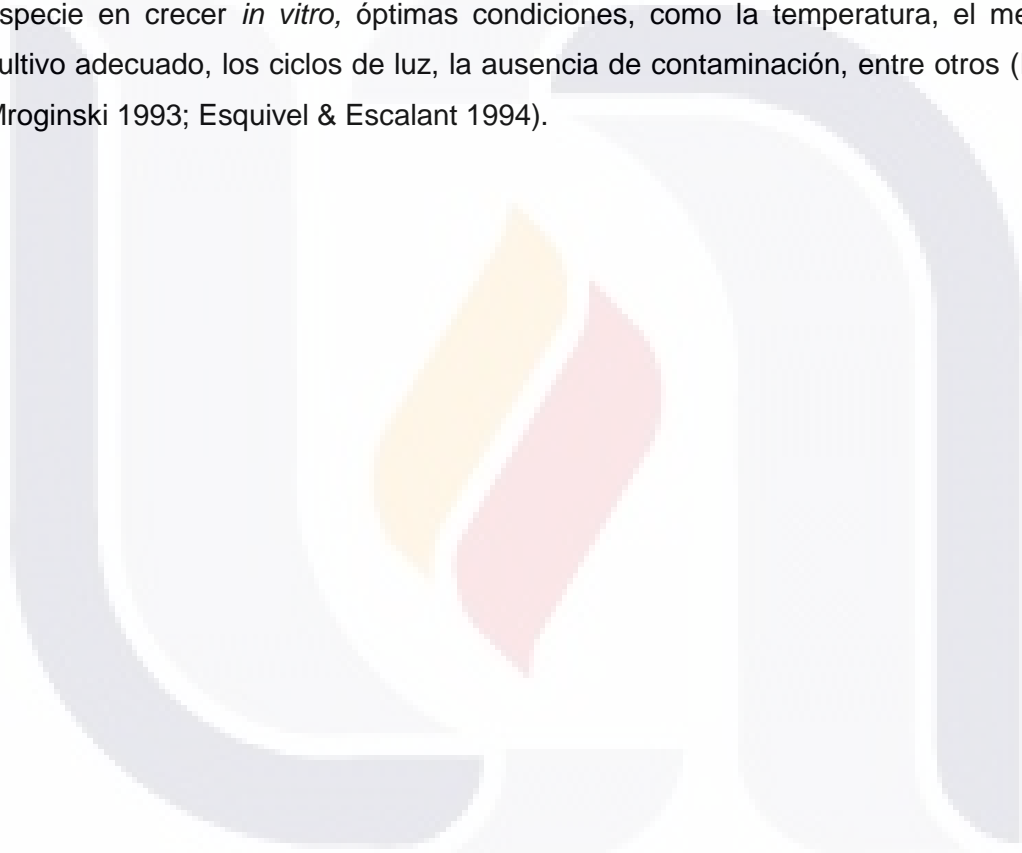
Los cultivos *in vitro* consisten en colocar una porción de la planta o llamado "explante" puede ser un ápice, hoja, tallo, embrión, semilla, etc en medio de cultivo estéril en el cuál se generaran una o muchas plantas. El contenido de nutrientes del cultivo de tejidos cambia según lo que se desee obtener, un tejido desdiferenciado, como el tejido calloso o tejidos diferenciados. El éxito de la propagación dependerá de la posibilidad de expresión de la potencialidad celular total, primero debe inducirse la desdiferenciación y posteriormente la rediferenciación celular (Esquivel & Escalant 1994).

La Micropropagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada, nos permite cultivar cualquier parte de la planta y que podrá dar lugar a un individuo completo de forma rápida, los cultivos se realizan en medios específicos de cultivos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con contenidos específicos de nutrientes y en condiciones ambientales controladas como la temperatura, los ciclos de luz y oscuridad. La micropropagación es un método biotecnológico de gran importancia, gracias a éste método se producen grandes cantidades de material que vana hacia la industria farmacéutica, alimentaria, ornamental, aromática, etc. (Calva & Pérez 2005).

El cultivo de meristemas se hace por las yemas apicales, donde se encuentran un grupo de células que forman el meristemo apical, esta parte del tejido tiene toda la capacidad de generar individuos completos, la velocidad de crecimiento de los tejidos dependerá de muchos factores como la misma potencialidad del meristemo o de la especie en crecer *in vitro*, óptimas condiciones, como la temperatura, el medio de cultivo adecuado, los ciclos de luz, la ausencia de contaminación, entre otros (Roca & Mroginski 1993; Esquivel & Escalant 1994).





### 3. JUSTIFICACIÓN

Moringa es un árbol originario del sub-Himalaya y del noroeste de la India, posee un alto contenido nutrimental, entre proteínas, vitaminas y minerales, además de tener efectos farmacológicos importantes en la salud como hipolipemiantes, antihelmínticos, antioxidantes por mencionar algunos. Moringa se puede utilizar como alimento, todas sus partes son comestibles y son ricas en nutrientes. En México, moringa se ha introducido y se ha adaptado al clima de zonas tropicales, semitropicales y secos como Baja California Sur, toda la costa del Pacífico y la costa del Golfo de México (Sonora, Chiapas, Guerrero, Yucatán, Veracruz, etc). En Aguascalientes no se tiene registro de que forma parte de la horticultura natural, sin embargo, las inducidas se han adaptado bien en traspatio e invernadero, por ser un árbol caducifolio, pierde sus hojas y parece secarse en presencia de frío aunque en primavera retoña, los CTV es una forma de mantener ejemplares en buenas condiciones durante todo el año sin variaciones genéticas.

Existen diversos análisis bromatológicos realizados en lugares como Guatemala, Cuba, diferentes países de África y en la India, sin embargo, no existen reportes de análisis de nutrientes en árboles de moringa *in vitro*, ni cultivadas en México, este estudio pretende brindar información sobre las plantas cultivadas de forma *in vitro* y *ex vitro* en la ciudad de Aguascalientes así como el análisis comparativo de nutrientes de árboles generados en la ciudad y los reportados en la literatura. De la misma manera no se tiene reportado el supuesto efecto hipoglucemiante de hojas de moringa en ratas *wistar* diabetizadas de forma crónica ni estudios histopatológicos de páncreas y riñón.

## 4. HIPÓTESIS

Las hojas de moringa generadas *in vitro* tienen un valor nutricional igual o menor que las *ex vitro*.

Las hojas de moringa poseen efecto hipoglucemiante en ratas *Wistar* diabetizadas.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio bromatológico de hojas de moringa generadas *in vitro*, *ex vitro* y aclimatadas y germinadas en sustrato y analizar el efecto hipoglucemiante de hojas de moringa en ratas *Wistar* diabetizadas y evaluar si existen cambios en el estado nutricional de ratas sanas.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Propagar plantas de moringa *in vitro* a partir de semillas, segmentos internodales, y yemas apicales, y propagar plantas *ex vitro* a partir de semillas.
2. Realizar el estudio bromatológico de hojas de moringa *in vitro* y *ex vitro*.
3. Analizar el efecto hipoglucemiante de hojas de moringa en ratas *Wistar* hiperglucémicas.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Propagación masiva *in vitro* y *ex vitro* de moringa por cultivo de tejidos vegetales

#### 6.1.1. Material vegetal

Se obtuvieron semillas de Moringa provenientes de tres localidades Guanajuato (Valle de Santiago), Baja California Sur (La Paz, Cabo San Lucas) y Morelos (Quebrantadero), de estas se propagaron plantas de forma *ex vitro* en condiciones de invernadero y en condiciones de laboratorio *e in vitro* por medio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) utilizando yemas apicales y segmentos internodales.

#### 6.1.2. Desinfección de semillas

El tratamiento de desinfección se realizó en campana de flujo laminar con material estéril, con Detergente Hyclean y Tween 20 durante 3 min, en agitación constante, posteriormente tres enjuagues con agua estéril, se lavó con etanol al 70% durante 3 min, después de tres enjuagues con agua estéril, en el lavado se utilizó hipoclorito de sodio al 10% durante 15 min y se enjuagó tres veces con agua estéril.

#### 6.1.3. Germinación

Se colocaron las semillas en condiciones axénicas en medio básico nutritivo Murashige y Skoog (1962) al 100%, Sacarosa al 3% y Agar al .7%, con pH 5,7, y esterilizado a 121°C durante 15 min. Las semillas se colocaron en el medio y se dejaron germinar en la obscuridad, al día 7 se revisó la germinación y se pasaron a luz con fotoperiodo controlado 16:8 luz/oscuridad hrs, con una temperatura de 25 °C ± 2 .

#### 6.1.4. Propagación

La propagación masiva se realizó haciendo cortes de los brotes provenientes de las semillas germinadas de aproximadamente de 1.5-3 cm de altura, segmentos de yemas axilares y apicales. Los explantes se sembraron en medio nutritivo MS al 100%, con fotoperiodo controlado 16:8 hrs luz/oscuridad con temperatura de 25 °C ± 2, sacarosa al 3% y agar al 0.7%. Se realizaron cinco podas de las semillas, después de un mes de la siembra en medio MS se resemebraron las semillas en buen estado a un nuevo medio MS, para continuar con su germinación. Los brotes provenientes de la germinación se pasaron a medio MS para su enraizamiento *in vitro*.

### 6.1.5. Enraizamiento y Aclimatación

Las plántulas se dejaron en medio MS sin reguladores de crecimiento, cuando las plántulas tuvieron suficientes raíces y alcanzaron una longitud mayor a 5 cm se aclimataron en sustrato peat moss. Se les retiró cuidadosamente el medio MS sólido de las raíces, las plántulas se colocaron en sustrato estéril peat moss, se cubrieron con una bolsa de plástico impidiendo el intercambio de aire con el medio y día tras día, se hicieron perforaciones hasta que la bolsa se perforó por completo para quedar al descubierto las plántulas. Se aclimataron en condiciones de laboratorio durante 4 semanas hasta que se pasaron al invernadero en Posta Zootécnica de la U.A.A., Jesús María, Aguascalientes, donde permanecieron ahí hasta el término de las investigaciones.

### 6.2. Análisis bromatológico de hojas de moringa

Se realizó un estudio Bromatológico ó Análisis Proximal de Esquema de Weende (1867) a partir de hojas secas de *Moringa oleifera*. Se obtuvieron dos muestras: hojas secas de una plantas *ex vitro* y de árboles aclimatados que fueron generados por cultivo de tejidos vegetales en la ciudad de Aguascalientes. Las hojas fueron secadas a la sombra en temperatura  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , y posteriormente al 100% de materia seca durante 12 hr a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.2.1. Humedad

Para el análisis de Humedad se pesó 1 g de cada muestra, en fresco y en peso seco, se registró el peso y se llevó a la estufa a una temperatura de  $100\text{-}115\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante por 4 hrs aproximadamente, se colocó en el desecador para evitar la hidratación, se registró peso exacto.

$$\text{Cálculos \% Humedad} = \frac{\text{pérdida de peso en gramos}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ de materia seca parcial} = 100 - \% \text{ de humedad}$$

#### 6.2.2. Extracto etéreo

Para el Análisis extracto etéreo o grasa cruda se pesó 1 gr de cada muestra y se colocó en el portadetal y se fijó en el condensador del aparato de extracción Goldfish. Se colocaron en el vaso 30-40 ml de éter, se colocó debajo del condensador cerrado herméticamente. Se abrió la llave del agua y las perillas hasta

que quedaron en contacto con el vaso. Se revisó si no existían fugas de éter y cuando el nivel del éter permaneció constante se observó periódicamente. A partir del proceso de ebullición se extrajo durante 4 hrs. Se retiró el vaso de extracción y el dedal, se colocó en el lugar colector de vidrio. Se destiló el éter, y poco antes de su evaporación hasta la sequedad se retiró y se llevó a la estufa a 100° C durante 40 min, se enfrió la muestra en el desecador y se determinó el peso de la grasa.

$$\text{Cálculos \%E.E.} = \frac{(\text{Peso del vaso con la grasa}) - (\text{Peso del vaso solo})}{\text{gr. De la muestra}} \times 100$$

### **6.2.3. Fibra cruda**

Para la determinación de fibra cruda se realizó por medio del aparato de digestión Labconco, se pesó directamente en la bolsa de filtración 1 g de muestra desgrasada y el peso de la bolsa solo y se selló. Se colocó la bolsa en el vaso y se le adicionó ácido sulfúrico (0.255 N) a temperatura ambiente en el Vessel (contenedor de los *tray*), se programó la digestión a 50 min en agitación y calentamiento, una vez pasado este tiempo se lavó con agua caliente 3 veces. Para la digestión alcalina se agregó hidróxido de sodio NaOH 0.312 N a temperatura ambiente y se programó tiempo de digestión de 45 min en agitación y calentamiento en el equipo. Transcurrido este tiempo se realizó en enjuague hasta el punto 8. Se le retiró el exceso de líquidos a las bolsas y se sumergió la bolsa en un vaso de precipitados con acetona, se removieron las bolsas y se eliminó el exceso para retirar los sobrantes de acetona. Se metieron las muestras a la estufa a 105°C durante 2-4 hrs, se enfrió en el desecador y se pesó. La muestra en la bolsa de papel se colocó en el crisol a peso constante y se calcinó durante 2 hrs a 550°C, se enfrió en el desecador y se pesó.

### **6.2.4. Proteína cruda**

Determinación de proteína cruda se realizó por el método de Dumas (AOAC, 968.06) de combustión interna, se realizó con el equipo Leco FP 528. El nitrógeno es liberado por pirolisis y subsiguiente combustión y acarreada por CO<sub>2</sub> al nitro metro. El CO<sub>2</sub> es absorbido en KOH y el nitrógeno es medido y convertido a equivalente de proteína por un factor numérico de conversión. Se corrieron 3 blancos y se calibró con 3 estándares de EDTA marca LECO. Se pesaron por triplicado *pellets* de 0.16 g de muestra en un papel de estaño y se analizó la muestra.

### 6.2.5. Cenizas

Para la determinación de cenizas se pesaron 1 g de muestra de hojas secas en un crisol a peso constante, se llevó a carbonización, posteriormente se llevaron a la mufla a 550-600° durante 6 hrs aproximadamente o hasta cenizas blancas o grises libres de carbón.

$$\text{Cálculos \% Cenizas} = \frac{\text{Peso del crisol más cenizas (g)} - \text{Peso del crisol (g)}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \times 100$$

### 6.2.6. Minerales

Para el Análisis de Minerales se realizó por Absorción Atómica en flama se usó el quipo AVANTA GBC, los cationes (Ca, Mn, Na y K) y micro elementos (Cu, Fe, Zn, Mn) se midieron con su respectiva lámpara y sus curvas de calibración. Se pesaron 3 gr de muestra de moringa seca, hojas *in vitro* y *ex vitro*, se calcinó en la mufla durante 6 hrs hasta llevarla a cenizas blancas, se digirió con ácido nítrico al 66.6% y se filtró.

## 6.3. Extractos de hojas secas de moringa para tratamiento de ratas *Wistar*

### 6.3.1. Extracto Acuoso

Se recolectaron hojas de *Moringa oleífera* de los árboles provenientes del invernadero. Las hojas previas a un método de desinfección, se secaron a la sombra, se pulverizaron en un molino. Se registró el peso inicial, el polvo de moringa se dejó macerar en agua destilada durante 24 hrs, posteriormente se pusieron a baño maría a 65° C durante 30 min, en constante agitación, se filtraron y pasaron por un rotavapor a 110° C. El concentrado del extracto se dejó en la estufa durante 24 hrs a 55° C.

### 6.3.2. Extracto Etanólico

Se recolectaron hojas de *Moringa oleífera* de los árboles que fueron generados por CTV provenientes del invernadero y hojas de árboles *ex vitro*. Las hojas previas a un método de desinfección, se secaron a la sombra, se pulverizaron en un molino. Se registró el peso inicial, el polvo de moringa se dejó macerar en proporción 80:20 etanol (96%) agua destilada durante 1 semana, posteriormente la maceración se filtró con



papel Whatman grado 1:11  $\mu\text{m}$ , se secó a 55 °C, el extracto filtrado se concentró por un rotavapor a 35 °C.

### **6.3.3. Hoja pulverizada**

Se tomaron hojas secas de moringa, previamente desinfectadas y secadas a la sombra a temperatura ambiente, pulverizadas y tamizadas. Este polvo se mezcló con agua potable y carboximetil celulosa, para obtener una suspensión.

## **6.4. Experimentos con ratas *wistar* diabetizadas y tratadas con extractos de hojas de moringa**

Se tomaron por muestreo simple aleatorio, 25 ratas *Wistar* hembras adultas procedentes del bioterio del Centro de Ciencias Básicas de la U.A.A., entre 2 ½ y 3 meses, con un peso entre 160 y 240 g; manteniéndose bajo condiciones de vida controladas. Con dieta normal estándar con nutricubos de la marca Purina®, y agua *ad libitum* con un ciclo de oscuridad de 12 hrs diarias.

### **6.4.1 Inducción de diabetes en ratas *wistar***

Para estudiar el supuesto efecto hipoglucemiante de hojas de moringa se realizaron dos experimentos con ratas *Wistar* a las cuales se les indujo *Diabetes Mellitus* por el método experimental con Streptozotocina (STZ) con dos refuerzos, basado en el protocolo Jaiswal *et al.*, (2009) y de Gupta *et al.*, (2012) con ciertas modificaciones basadas en las observaciones que realiza Junod *et al.*, (1969).

### **6.4.2. Primer experimento; 50 mg/kg de STZ con dos refuerzos**

Se mantuvieron 25 ratas *wistar*, durante ayuno de 12 hrs, se les dió agua *ad libitum*, se registró el peso de cada animal cada siete días, se registró el alimento y agua consumida durante todo el experimento. Se dividieron en cuatro grupos de cinco ratas cada uno. A tres grupos se les indujo *Diabetes mellitus* con estreptozotocina STZ vía intraperitoneal IP (SIGMA- ALDRICH Streptozocin  $\geq 75\%$   $\alpha$ -anomer basism  $\geq 98\%$  (HPLC) powder), se les inyectó al día 0 del experimento y 2 refuerzos cada tercer día de 50 mg/kg de peso diluído en 1 ml de solución de citrato al 0.4 M a pH de 4.5 (Gupta *et al.*, 2012). Los grupos diabéticos: Grupo C; Diabetes sin tratamiento, Grupo D; *Diabetes* + extracto etanólico de moringa 300 mg/kg, Grupo F; *Diabetes* + metformina 350mg/kg (Penicaud *et al.*, 1989). Los grupos marcados como Control negativo se inyectaron 1 ml de solución de citrato, y el grupo Control positivo se diabetizó más no recibió tratamiento alguno. Hrs después de las inyecciones se volvieron a alimentar.

(Protocolo UAA prácticas fisiología y farmacología Diabetes mellitus y efectos de la insulina en la rata). Se dejaron dos grupos sin diabetizar; Grupo B Control y Grupo H ratas con Diabetes + Moringa. Todos los tratamientos fueron administrados a las 9:00 am diariamente vía oral con una cánula, todos los tratamientos fueron proporcionados cada 24 hrs. Posterior a los 42 días del experimento se sacrificaron todos los animales, se les retiró páncreas y riñón para posteriormente hacer cortes histológicos y observar los posibles cambios morfológicos. Los respectivos órganos se retiraron y se enjuagaron inmediatamente en solución fisiológica al 9% e inmediatamente se sumergieron en paraformaldehído al 4% para la fijación de los tejidos, al cabo de 4 semanas se procedió a realizar los cortes.

**Tabla 3.** Grupos experimentales de tratamiento de ratas del primer experimento.

<b>Grupos</b>	<b>Grupos experimentales: con diabetes</b>	<b>N. de ratas Wistar</b>
<b>C</b>	<i>Diabetes</i> sin tratamiento	5
<b>D</b>	<i>Diabetes</i> + extracto etanólico de moringa 300 mg/kg	5
<b>F</b>	<i>Diabetes</i> + Metformina 350 mg/kg (Penicaud <i>et al.</i> , 1989)	5
Sin diabetes		
<b>B</b>	<b>Control + vehículo (Carboximetil celulosa)</b>	<b>5</b>
<b>H</b>	Sin <i>Diabetes</i> + moringa hoja pulverizada 300 mg/kg	5

Las ratas fueron alimentadas con dieta normal estándar, grupo B) control C) *Diabetes* sin tratamiento D) diabetes con extracto etanólico F) diabetes con metformina H) ratas sin diabetes y con hoja pulverizada

### 6.4.3. Segundo experimento; 50 mg/kg de STZ y un refuerzo

El segundo experimento diferenció en la dosis, que fueron 50 mg/kg de STZ durante dos días, al inicio de la inducción y un refuerzo a los 7 días. Se dividieron en 5 grupos de cinco ratas cada uno. Los grupos diabéticos: Grupo C; *Diabetes* sin tratamiento, Grupo D; *Diabetes* + extracto etanólico de moringa 300 mg/kg, Grupo F; *Diabetes* + Sitagliptina 100 mg/kg (Ferreira *et al.*, 2010); Grupo I; *Diabetes* + extracto acuoso de moringa 300 mg/kg. Todos los tratamientos fueron proporcionados cada 12 hrs. Posterior a los 49 días del experimento se sacrificaron todos los animales, se les retiró páncreas y riñón para posteriormente hacer cortes histológicos y observar los posibles cambios morfológicos. Los respectivos órganos se retiraron y se enjuagaron inmediatamente en solución fisiológica al 9% e inmediatamente se sumergieron en paraformaldehído al 4% para la fijación de los tejidos, al cabo de 4 semanas se procedió a realizar los cortes. Para los dos experimentos se realizaron las mismas mediciones; peso, glucosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales e insulina.

**Tabla 4.** Grupos experimentales de tratamiento de ratas del segundo experimento.

<b>Grupos</b>	<b>Grupos experimentales: con <i>Diabetes</i></b>	<b>No de ratas <i>Wistar</i></b>
<b>C</b>	Diabetes sin tratamiento	5
<b>D</b>	<i>Diabetes</i> + extracto etanólico de moringa 300 mg/kg	5
<b>F</b>	<i>Diabetes</i> + Sitagliptina 100 mg/kg (Penicaud <i>et al.</i> , 1989)	5
<b>I</b>	<i>Diabetes</i> + extracto acuoso de moringa 300 mg/kg	5
<b>B</b>	Control + vehículo (Carboximetil celulosa)	5

Las ratas fueron alimentadas con dieta normal estándar, grupo B) control C) Diabetes sin tratamiento D) Diabetes con extracto etanólico de hojas de moringa F) Diabetes con Sitagliptina I) Diabetes con extracto acuoso de hojas de moringa.

### 6.4.4. Toma de muestra sanguínea de ratas *Wistar*

Con 12 hrs de ayuno, las ratas se pesaron semanalmente, y se les tomó muestra sanguínea del plexo orbital, los animales fueron anestesiados en una cámara de Éter cada 7 días, siendo los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 y 49 se separó el suero del

paquete globular en la microcentrífuga durante 20 min a 6000 rpm. El suero resultante después de las mediciones clínicas se refrigeró a -20°C hasta el momento de su uso. Una vez descongelado se conservó a -4°C.

#### **6.4.5. Mediciones de química clínica en ratas *Wistar***

Para las respectivas mediciones de química clínica, se tomaron los sueros problemas con el reactivo indicado y se leyó en un Espectrofotómetro de UV Vis GENESYS™ 10S a diferentes longitudes de onda, se describen a continuación.

##### **6.4.5.1. Glucosa**

La glucosa en suero se cuantificó por medio de un método enzimático con un Kit de Glucosa Oxidasa y (GOD) y peroxidasa (POD) MEXLAB® . Se colocó 1 mL de *reactivo líquido para la determinación fotométrica de Glucosa LS. De MEXLAB* ,en un tubo de ensaye, para preparar el blanco solo se colocó 1 mL de reactivo, para el calibrador se preparó 1 mL de reactivo y se agregaron 10 µL de solución estándar, a los tubos de ensaye problema se les coloca 1 mL de reactivo y se le agregan 10 µL de los respectivos sueros problemas. Mezclar se incubaron 5 min a 37°C. Se leyeron las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco del reactivo a una absorbancia de 505 nm. El color resultante fue estable por al menos treinta min.

##### **6.4.5.2. Colesterol**

Las pruebas séricas de colesterol se realizaron por un método enzimático, con un Kit de Química-Clínica COLESTEROL TOTAL (CHOD –PAP) MEXLAB®. Se colocó 1 mL *Reactivo líquido para la determinación fotométrica de Colesterol total en suero o plasma MEXLAB* de COLESTEROL TOTAL (CHOD –PAP) en un tubo de ensaye, se prepararon muestras problema y el blanco solo se le adicionaron 1 mL de reactivo, para el calibrador se prepararon 1 mL de reactivo y se le agregaron 10 µL de solución estándar, a los tubos de ensaye problema se les colocaron 1 mL de reactivo y se le agregaron 10 µL de los respectivos sueros problemas. Se mezclaron e incubaron 5 min a 37°C. Se leyeron las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco del reactivo a una absorbancia de 505 nm. El color resultante fue estable por al menos treinta min.

### 6.4.5.3. Triglicéridos

Para la determinación de la concentración sérica de triglicéridos se hizo por medio del Kit de Química-Clinica TRIGLICÉRIDOS – LS (GPO – PAP) MEXLAB®

Se colocó 1 mL de *Reactivo líquido para la determinación fotométrica de Triglicéridos en suero o plasma* MEXLAB TRIGLICÉRIDOS – LS (GPO – PAP) en un tubo de ensaye, para el blanco se colocaron 1 mL de reactivo, para el calibrador se prepararon 1 mL de reactivo y se le agregaron 10 µL de solución estándar, a los tubos de ensaye problema se les colocaron 1 mL de reactivo y se le agregaron 10 µL de los respectivos sueros problemas. Se mezcló y se incubó 5 min a 37°C. Se leyeron las absorbancias llevando a cero el espectrofotómetro con el blanco del reactivo a una absorbancia de 520 nm. El color resultante fue estable por al menos treinta min.

### 6.4.5.4. Proteínas Totales

Para la determinación de la concentración sérica de proteínas totales se hizo por medio del Kit de PROTEINA TOTAL (BIURET) MEXLAB®

Se colocaron 1 mL de con *Reactivo líquido para la determinación fotométrica de Proteína Total* PROTEINA TOTAL (BIURET) en suero y plasma en un tubo de ensaye, para preparar el blanco se colocaron 1 mL de reactivo, para el calibrador se prepararon 1 mL de reactivo y se le agregaron 10 µL de solución estándar, a los tubos de ensaye problema se les colocaron 1 mL de reactivo y se le agregaron 10 µL de los respectivos sueros problemas. Se mezcló y se incubó 5 min a 37°C. Las absorbancias se leyeron a 540 nm. El color resultante fué estable por al menos treinta min.

### 6.4.5.5. Insulina

La detección de la concentración de insulina en los sueros de los animales control y problemas, se hizo mediante un inmuno ensayo enzimático (ELISA). Una placa de 96 pozos se forró con Anticuerpo Anti-insulina 1:20000 en solución de carbonados/bicarbonatos pH 9.6 y se incubó durante toda la noche a 4° C, una vez finalizado este tiempo se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05%. La curva patrón consistió en colocar 2 µl de Insulina Humana en 100µl de PBS 1X en la columnas 1 y 2 de la placa, posteriormente se hicieron diluciones por duplicado en los pozos A hasta los H. Los pozos del resto de la placa se forraron con 90µl de PBS 1X y 10µl del suero problema por triplicado, la placa se incubó durante 2 hrs (1 hr a 37°C y 1 hr a temperatura ambiente), se hicieron 3 lavados con PBS-Tween. Posteriormente, se agregaron 100µl del Anticuerpo IgG de ratón Anti-insulina diluido 1:20000 en PBS 1X durante 2 hrs; a continuación, se hizo lavado de la placa por 3 veces con PBS-Tween.

Finalmente, se aplicaron 100µl del segundo anticuerpo Cabra anti IgG de ratón-PO 1:20000, se incubó durante 2 hrs y se lavó tres veces con PBS-tween. Para el revelado se utilizó Ortofenilendiamina diluida en ácido cítrico y fosfato dibásico de sodio con agua destilada y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, se detuvo la reacción a los 3 min con 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 25% en cada pozo. Posteriormente se leyó en el espectrofotómetro a 490 nm.

#### **6.4.6. Histopatología**

Para estos análisis histopatológicos se realizó por medio de la tinción de Hematoxilina-eosina.

##### **6.4.6.1. Tincion con hematoxilina eosina**

1. Después de la desparafinización los cortes histológicos en la estufa a 58°C , se colocaron en las soportes de vidrio pertenecientes al tren de tinción, el cual consta del siguiente proceso:
2. Se montó en Entellan las laminillas y se observaron en microscopio campo claro Micro Zeizz.
3. Sumergir los preparados histológicos en xilol para eliminar los excesos de parafina.
4. Luego pasan por una serie de alcoholes (100°. 96° y 70°) durante 2 min.
5. Se lava en agua para eliminar exceso de alcohol con agua destilada por 3min.
6. Se sumerge en hematoxilina de Harris por 3 minutos, luego se lava en agua destilada por 10 min para eliminar excesos y se pasa rápidamente por alcohol ácido.
7. Se lava nuevamente
8. Se sumerge 3 minutos en eosina y se lava con agua destilada por 3 min,
9. Se pasa por otra serie de alcoholes, en orden creciente (70°, 96° y 100°).
10. Finalmente se deja remojar 5 minutos en xilol, antes de realizar el montaje final



## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó un el análisis estadístico con el paquete GraphPad PRISM® versión 6.01 para Microsoft, para el análisis bromatológico se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores, en el análisis comparativo una prueba de *t*-Student añadiéndole a la Media su Desviación estándar con un 95% de confianza. Para el resto de las mediciones clínicas se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores para cada uno de los valores a analizar de química clínica y concentración de insulina con un nivel de confianza del 95% y análisis comparativo de Tukey. El reporte completo de ANOVA y sus supuestos se encuentran en los anexos.



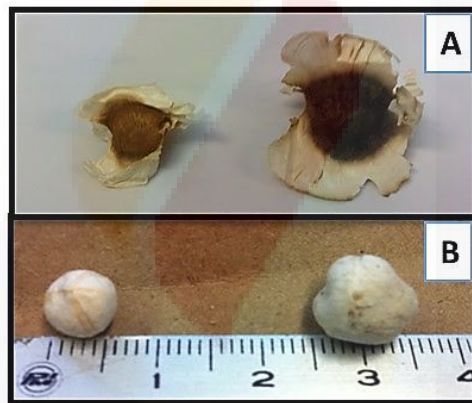
## 8. RESULTADOS

Este método consiste en introducir ciertas dosis de un fármaco con alta toxicidad y selectividad para las células  $\beta$  pancreáticas llamado estreptozotocina STZ.

### 8.1. Propagación *in vitro*

#### 8.1.1. Desinfección, Propagación y Enraizamiento *in vitro*

Se propagaron plantas de moringa por medio de cultivo de tejidos vegetales provenientes de tres localidades, en la figura 5 y 6 a la izquierda semillas de Valle de Santiago Guanajuato y a la derecha semillas de La Paz. Las semillas provenientes Guanajuato, tenían un tamaño de 0.5 cm, mientras que las de Baja California Sur 1 cm.



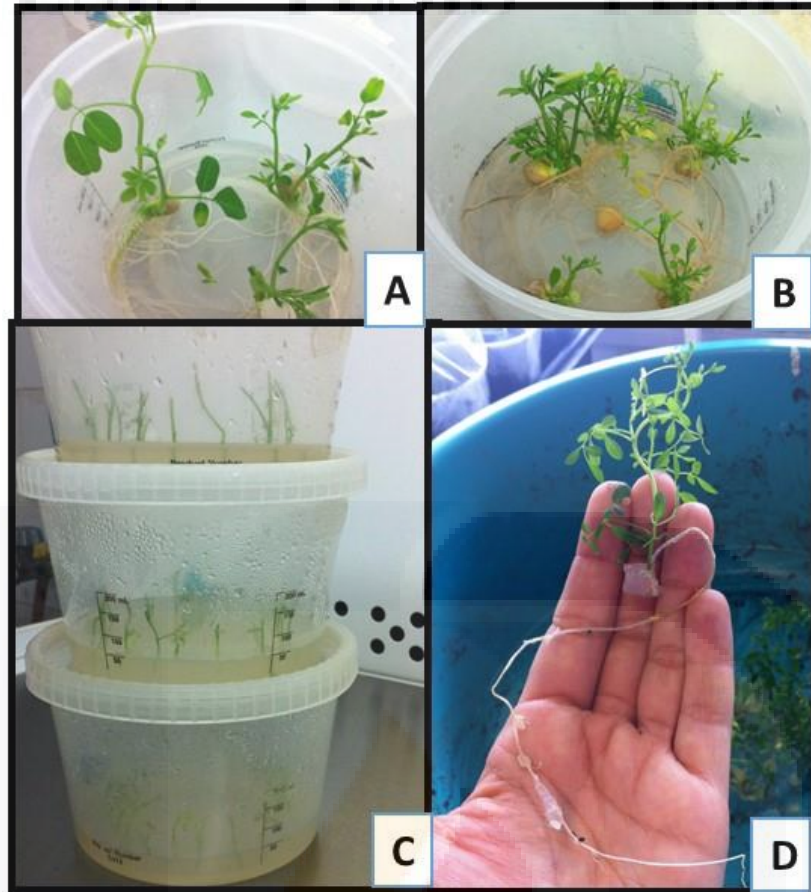
**Figura 5.** Semillas de *Moringa oleífera* provenientes de distintas localidades. A la izquierda semillas de Guanajuato (Valle de Santiago) y derecha de Baja California Sur (La Paz).

En la figura 6 se muestran varias semillas recién obtenidas de vainas secas provenientes de dos localidades, previas a un método desinfección, se aprecian aún con la testa, a la izquierda semillas de Guanajuato (Valle de Santiago) y derecha de Baja California Sur (La Paz).



**Figura 6.** Semillas de *Moringa oleifera* con testa. Derecha; semillas de La Paz, BCS, izquierda; semillas de Valle de Santiago, Guanajuato.

Se sembraron cinco semillas de Guanajuato, veintiuno semillas de La Paz y ocho de Morelos, todas recibieron el método de desinfección. El método de desinfección de semillas fue efectivo en un 95% únicamente el 5% de las semillas resultaron contaminadas. La germinación *in vitro* fue efectiva en 90% en medio basal MS sin reguladores de crecimiento. La etapas de propagación se muestran en la figura 7, la primera germinación (A), semillas en la quinta poda (B), propagación de yemas apicales y segmentos internodales (C) y en la figura (D) plántulas con una longitud adecuada y suficientes raíces para aclimatar en sustrato estéril peat moss.



**Figura 7.** Etapas de propagación de moringa. A) muestra la germinación *in vitro* en la primer poda, B) Quinta poda de las semillas C) Propagación en medio MS solido de segmentos internodales y yemas apicales D) planta de moringa con suficiente follaje, raíces y 5 cm de altura, adecuados para la aclimatación

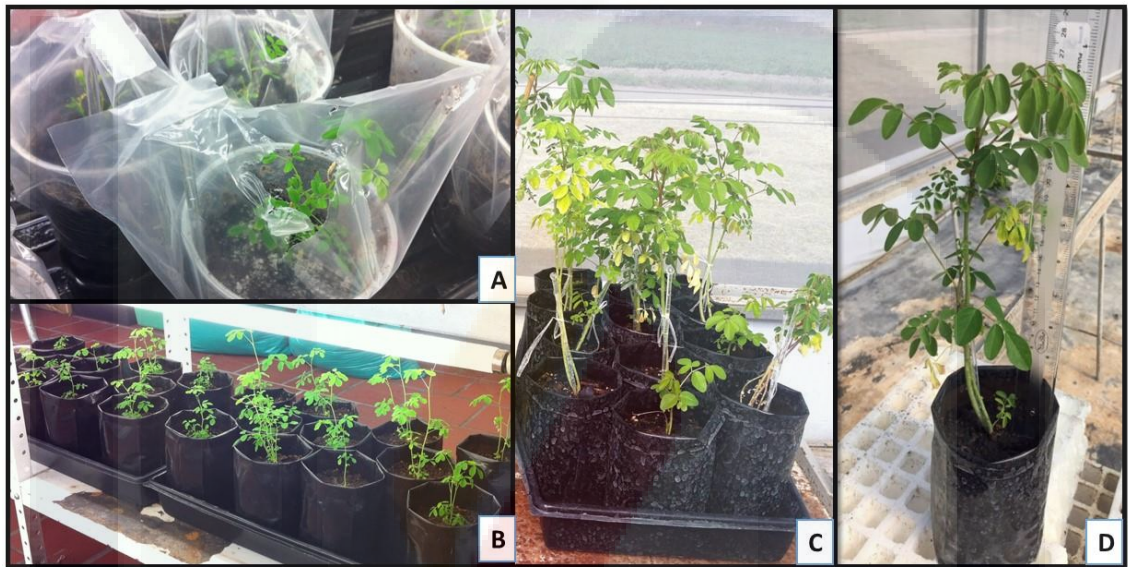
### 8.1.2. Aclimatación

Se aclimataron veintisiete plántulas de Guanajuato, cincuenta y nueve plántulas de La Paz y seis plantulas de Morelos como se muestra en la tabla 5. Las plántulas se aclimataron adecuadamente en sustrato peat moss libre de contaminantes como hongos y bacterias como se muestra en la figura 8A y 8B. Se logró una tasa de supervivencia del 70% a la aclimatación y el 100% de supervivencia en condiciones de invernadero (figura 9.)

En la figura 8 se muestran las plantas por CTV en proceso de aclimacation. Posterior al enraizamiento en medio MS las platulas se pasaron a sustrato estéril peat moss (figura 8A), las que pudieron aclimatarse (figura 9), después a un crecimiento de entre 15 y 25 cm se pasaron a bolsas negras (figura 8B), posterior a cuatro semanas

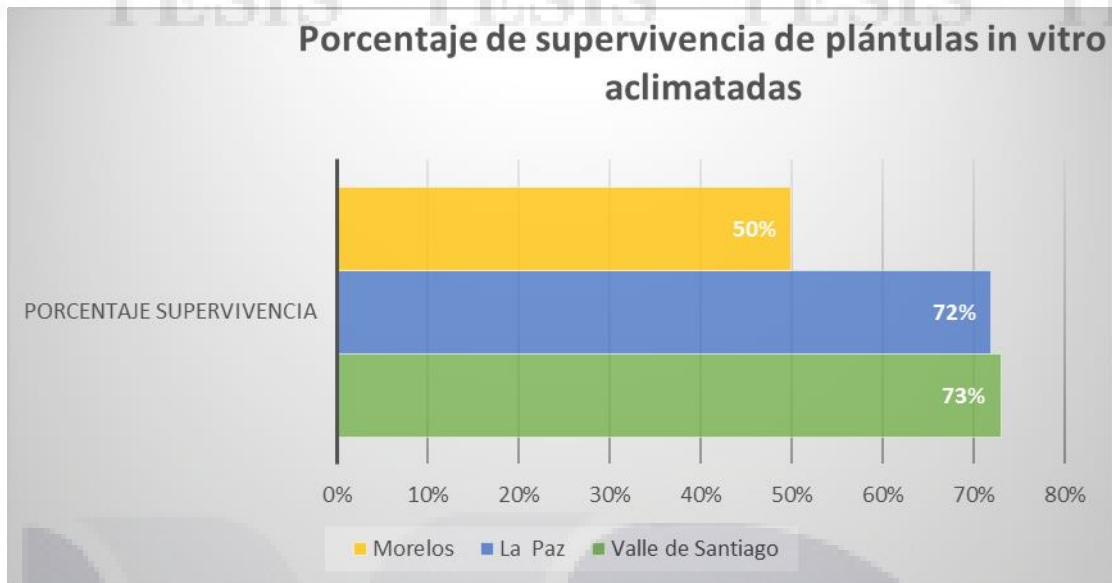


acimatándose en laboratorio con luz artificial se llevaron al invernadero de Posta Zootecnica. Después de tres meses en invernadero las plantas jóvenes de moringa engrosaron su tallo y se elongaron (figura 8C). La imagen 8D muestra un ejemplar de plántula por CTV después de 4 meses en invernadero. Las que pudieron aclimatarse se desarrollaron bien en condiciones de laboratorio logrando una adecuada elongación y engrosamiento del tallo, alcanzado una altura considerable. Se logró una tasa de supervivencia del 70% de plántulas aclimatadas por CTV en condiciones de invernadero.



**Figura 8.** Aclimatación de plantas generadas *in vitro*. A) plántulas de moringa aclimatándose en sustrato estéril peat moss. B) plántulas de moringa después de 4 semanas se pasana bolsas negras mas grandes. C) Árboles jóvenes de moringa en invernadero. D) Un ejemplar de árbol de moringa después de 4 meses en invernadero.

En la figura 9, se muestran los porcentajes de supervivencia de plántulas generadas por CTV de las tres localidades, en verde plántulas de semillas de Valle de Santuago, en azul plántulas de semillas de La paz, en amarillo las pántulas de semillas de Morelos. Las plántulas que tuvieron un mejor orcentaje de aclimatación fueron las de Guanajuato y Baja California Sur.



**Figura 9.** Porcentaje de supervivencia de plantas *in vitro*. Plantas aclimatadas de tres localidades, Valle de Santiago Guanajuato, La Paz Baja California Sur y Quebrantadero Morelos.

## 8.2. Propagación *ex vitro*

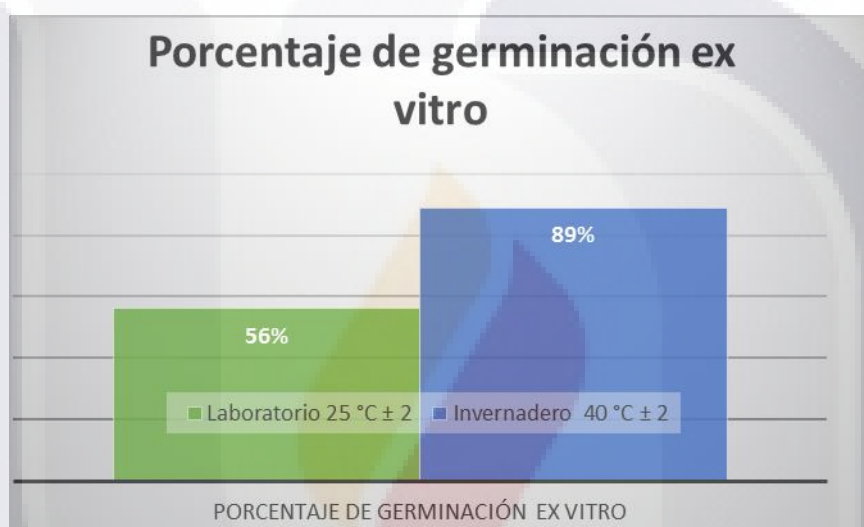
Se sembraron 80 semillas *ex vitro* de Guanajuato en condiciones de laboratorio, las cuales no germinaron y 108 semillas de Baja California Sur (BCS), de las cuales 69 fueron en condiciones de invernadero, como se muestra en la tabla 5. Se obtuvo 56% de supervivencia para la germinación *ex vitro* en condiciones de laboratorio y 89% en condiciones de invernadero (figura 11) (posta Zootécnica de la U.A.A). Jesús María, Aguascalientes.



**Figura 10.** Etapa de propagación de plantas de *Moringa oleífera ex vitro* en invernadero. En la figura 10A; germinación de semillas en charolas al día 7 de la siembra, en la figura 10B; se muestran plántulas con suficiente altura y raíces para sembrarlas en espacios más grandes.



Las semillas que se sembraron *ex vitro* germinaron al día 5 y al día 15 después de la siembra (figura 10A), las plántulas presentaban una altura entre los 10 y 15 cm de longitud con un buen patrón de enraizamiento (figura 10B). En ese momento se pasaron a bolsas de plástico negras con sustrato peat moss como se muestra en la figura 12 al día 60 posterior a la siembra, las plantas presentaban un altura entre los 20 y 30 cm con amplio follaje (árboles jóvenes del lado izquierdo de la figura 12). Los árboles germinados en invernadero eran más frondosos y algunos con mayor altura y grosor del tallo, las hojas para los análisis de composición de alimentos y el experimento fitoquímico fueron tomados de estos árboles



**Figura 11.** Porcentaje de germinación de semillas *ex vitro* en condiciones de laboratorio (Temperatura 25± 2°C ) y en condiciones de Invernadero (Temperatura 40± 2°C).

**Tabla 5.** Resumen de semillas germinadas *in vitro* y *ex vitro*.

Localidad	No de semillas <i>in vitro</i>	Días en germinar <i>in vitro</i>	Plántulas aclimatadas <i>in vitro</i>	No de semillas <i>ex vitro</i>	Días en germinar <i>ex vitro</i> <i>Laboratorio</i>	Días en germinar <i>ex vitro</i> <i>Invernadero</i>	Plántulas en aclimatadas <i>ex vitro</i>
Guanajuato	5	7-8	27	80	No germinaron	ND	ND
Baja California Sur	21	7-10	59	108	5-15	4-7	69
Morelos	8	6-8	6	ND	ND	ND	ND
TOTAL	34		92	188			69

Se muestran los días que tardaron en germinar las semillas y numero de plantas generadas. ND; No hay Datos.

En la figura 12 se aprecian todas las plantas de moringa generadas por *in vitro* o *ex vitro*. En la imagen se muestran las plántulas que se propagaron *in vitro* (a la derecha) y después de 9 meses alcanzaron una altura de 60 cm. Las plántulas a la izquierda son plántulas germinadas *ex vitro* en invernadero presentan amplio follaje y altura.



**Figura 12.** Propagación de plantas de Moringa oleífera aclimatadas en invernadero, tanto *in vitro* como *ex vitro*.

## 8.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y MINERALES

Para estos estudios se realizaron diversas cosechas de hojas frescas de plantas de moringa del invernadero, tanto *in vitro* como *ex vitro*, éstas hojas se colectaron, desinfectaron y se secaron a la sombra (figura 13). Se realizó el análisis de composición de alimentos y los resultados reportados por 100 g se muestran con su media y desviación estándar y se compararon entre sí hojas *in vitro* con *ex vitro*, *ex vitro* contra la reportada en la literatura y las hojas de muestras *in vitro* comparadas con las de la literatura (Tablas 6, 7 y 8). Específicamente se midieron las cantidades de proteína cruda, cenizas, fibra cruda, extracto etéreo (grasa), humedad, carbohidratos asimilables y aporte calórico. Se realizó el análisis de minerales por medio de absorción atómica de masas en flama de hojas secas de moringa de plantas *in vitro* y *ex vitro*. (figura 13).



**Figura 13.** Hojas secas de *Moringa oleifera* tomadas de árboles *in vitro* y *ex vitro*.

Se realizó un análisis estadístico del estudio bromatológico de macronutrientes de hojas secas de *Moringa oleifera* *ex vitro* contra la referencia reportada en la literatura y los resultados se muestran en la tabla 6. Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis de una prueba de t-student. Se realizaron los análisis bromatológicos con la finalidad de conocer si los cultivos obtenidos en nuestro laboratorio eran similares a las plantas de origen silvestre, cultivadas y comerciales, se compararon las propiedades nutrimentales de nuestras plantas cultivadas *in vitro* y *ex vitro* con las propiedades presentes en las plantas de otros países y las reportadas por una casa comercial que distribuye hojas secas de moringa encontrando que tanto las plantas cultivadas *in vitro* como *ex vitro* tienen propiedades nutricionales similares a las reportadas en la literatura ya que no se encontró significancia en los valores obtenidos en nuestro estudio en cuanto a proteína cruda, cenizas, grasa, fibra cruda, ELN ni energía para ninguno de los dos casos, solamente se encontró diferencia en el contenido de proteína total entre hojas *ex vitro* y la referencia ( $p$  0.0059) tabla 6.

**Tabla 6.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa *ex vitro* contra la referencia reportada en la literatura por cada 100 g

**HOJAS SECAS**

	<b>EX VITRO</b>		<b>REFERENCIA</b>		<b>VALOR p</b>
	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	
Proteína Cruda %	27.64	3.69	24.57	3.580	0.0059
Cenizas %	12.15	0.33	12.04	0.069	0.6692
Grasa %	8.73	1.15	6.78	0.255	0.078
Fibra Cruda %	6.08	1.99	7.52	1.89	0.05198
ELN %	44.51	0.88	46	0	ND
Energía %	367.24	5.86	330.52	30.789	0.2533

Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student de muestra *ex vitro* y valores de referencia mostrando el valor p, con un 95% de confianza. N=3.

Se realizó el análisis estadístico del reporte del bromatológico de macronutrientes de hojas secas de Moringa oleífera *in vitro* contra la referencia reportada en la literatura (tabla 7), al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con prueba de t-student.

**Tabla 7.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de Moringa oleífera *in vitro* contra la referencia reportada en la literatura por cada 100 g

**HOJAS SECAS**

	<b>IN VITRO</b>		<b>REFERENCIA</b>		<b>VALOR p</b>
	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	
Proteína Cruda %	23.24	5.69	24.57	3.58	0.5002
Cenizas %	12.68	0.24	12.04	0.06	0.2026
Grasa %	11.1	2.89	6.78	0.25	0.4188
Fibra Cruda %	10.11	1.91	7.523	1.89	0.3561
ELN %	43.023	3.92	46	0	
Energía %	364.96	13.30	330.52	30.78	0.2533

Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student de muestra *ex vitro* y valores de referencia mostrando el valor p, con un 95% de confianza. N=3.

El reporte estadístico del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de Moringa oleífera *ex vitro* contra las *in vitro* se presenta en la tabla 8. Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student. Se realizaron estudios comparativos de cómo el cultivo *in vitro* afecta las propiedades nutricionales finales en las hojas secas de moringa encontrando que no existen diferencias significativas en la cantidad de proteínas, cenizas, grasa, fibra cruda, ELN y energía que una planta cultivada *in vitro* posee frente a una planta con un cultivo tradicional. Como muestra en la tabla 8 no hay diferencia significativa entre las hojas *in vitro* y *ex vitro* en los elementos analizados del bromatológico.

**Tabla 8.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de Moringa oleífera *ex vitro* contra las hojas *in vitro* por cada 100 g

**HOJAS SECAS**

	<i>IN VITRO</i>		<i>EX VITRO</i>		VALOR <i>p</i>
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	
Proteína Cruda %	23.24	5.69	27.64	3.699	0.5002
Cenizas %	12.68	0.24	12.15	0.33	0.2026
Grasa %	11.1	2.89	8.73	1.155	0.4188
Fibra Cruda %	10.11	1.91	6.08	1.99	0.1138
ELN %	43.02	3.92	44.51	0.88	
Energía %	364.9667	13.30	367.24	5.86	0.1854

Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student de muestra *ex vitro* y valores de referencia mostrando el valor *p*, con un 95% de confianza. N=3.

El análisis estadístico del reporte de micronutrientes de hojas secas de Moringa oleífera *ex vitro* contra la referencia reportada en la literatura se presenta en la tabla 9 se le añade al valor de la media la desviación estándar, con análisis respectivo con una prueba de t-student, arroja valores sin significancia estadística en los niveles de cobre, hierro, manganeso, zinc, potasio, calcio y manganeso.



**Tabla 9.** Reporte del análisis bromatológico de micronutrientes de hojas secas de moringa ex vitro contra las hojas de referencia por cada 100 g

**HOJAS SECAS**

	<b>EX VITRO</b>		<b>REFERENCIA</b>		
	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>VALOR p</b>
Cobre mg	0.630	0.24	0.946	0.57	0.4707
Hierro mg	29.84	26.71	22.95	9.48	0.6449
Manganeso mg	5.48	1.07	8	0	0.0559
Zinc mg	3.88	3.36	2.73	0.56	0.6596
Potasio mg	1377.11	309.59	1445	125	0.6813
Sodio mg	250.23	260.94	1327.44	1736.69	0.433
Calcio mg	2330.73	908.38	2126	115.87	0.7029
Magnesio mg	250.84	219.59	1919	2544.85	0.3965

Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student de muestra ex vitro y valores de referencia mostrando el valor p, con un 95% de confianza. N=3.

A su vez, en el estudio comparativo de los valores de los micronutrientes presentes en las hojas secas de las plantas de moringa cultivadas *in vitro* en nuestro laboratorio contra los valores reportados en estudios de plantas en otros países encontramos que existe una cantidad significativamente mayor de potasio ( $2609.567 \pm 324.209 \text{mg}/100\text{g}$  vs  $1445 \pm 125 \text{mg}/100\text{g}$   $p=0.0116$  tabla 10) en las plantas cultivadas *in vitro* en comparación con los valores ya conocidos para esta especie, sin embargo, no se encontró significancia estadística en los valores de cobre, hierro, manganeso, zinc, sodio, calcio ni magnesio.

**Tabla 10.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa *in vitro* contra hojas de referencia por cada 100 g.

**HOJAS SECAS**

	<b>IN VITRO</b>		<b>REFERENCIA</b>		<b>VALOR p</b>
	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	
Cobre mg	1.47	1.75	0.94	0.57	0.5251
Hierro mg	45.85	50.81	22.95333	9.48	0.4852
Manganeso mg	5.01	1.60	8	0	0.0839
Zinc mg	3.653	2.04	2.73	0.56	0.5792
Potasio mg	2609.56	324.20	1445	125	<b>0.0116</b>
Sodio mg	428.49	241.70	1327.44	1736.69	0.5021
Calcio mg	1934.62	910.87	2126	115.87	0.7306
Magnesio mg	951.83	577.62	1919	2544.85	0.4879

Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student de muestra *ex vitro* y valores de referencia mostrando el valor p, con un 95% de confianza. N=3.

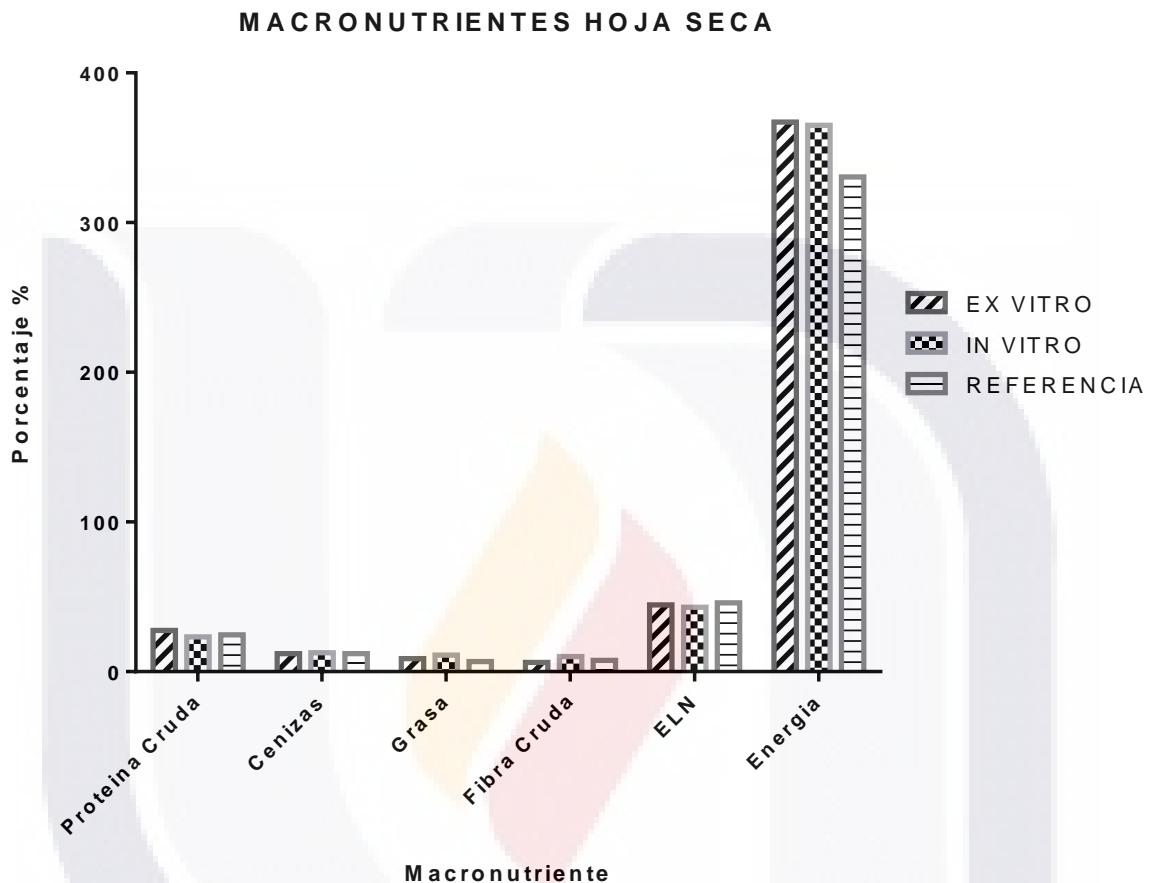
También se encontró que la manera en la que se cultivan las semillas afecta en los niveles de sodio y potasio que las hojas secas contendrán (tabla 11). Así, tenemos que las plantas cultivadas *in vitro* concentran una cantidad estadísticamente significativa mayor de potasio ( $p=0.0314$ ) y sodio (0.0095) que las plantas cultivadas *ex vitro*. Encontrando al mismo tiempo que los diferentes medios de cultivo no afectan de manera importante en la concentración de cobre, hierro, manganeso, zinc, calcio y magnesio que las hojas secas de la planta poseen.

**Tabla 11.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas secas de moringa *ex vitro* contra las hojas *in vitro* por cada 100 g.

<b>HOJAS SECAS</b>					
	<b>IN VITRO</b>		<b>EX VITRO</b>		<b>VALOR p</b>
	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	
Cobre mg	1.470	1.75	0.63	0.24	0.4878
Hierro mg	45.85	50.81	29.84	26.71	0.3757
Manganeso mg	5.01	1.60	5.48	1.07	0.0559
Zinc mg	3.65	2.04	3.88	3.36	0.9133
Potasio mg	2609.56	324.20	1377.11	309.59	<b>0.0314</b>
Sodio mg	428.49	241.70	250.23	260.94	<b>0.0095</b>
Calcio mg	1934.62	910.87	2330.73	908.38	0.1857
Magnesio mg	951.83	577.62	250.84	219.59	0.2545

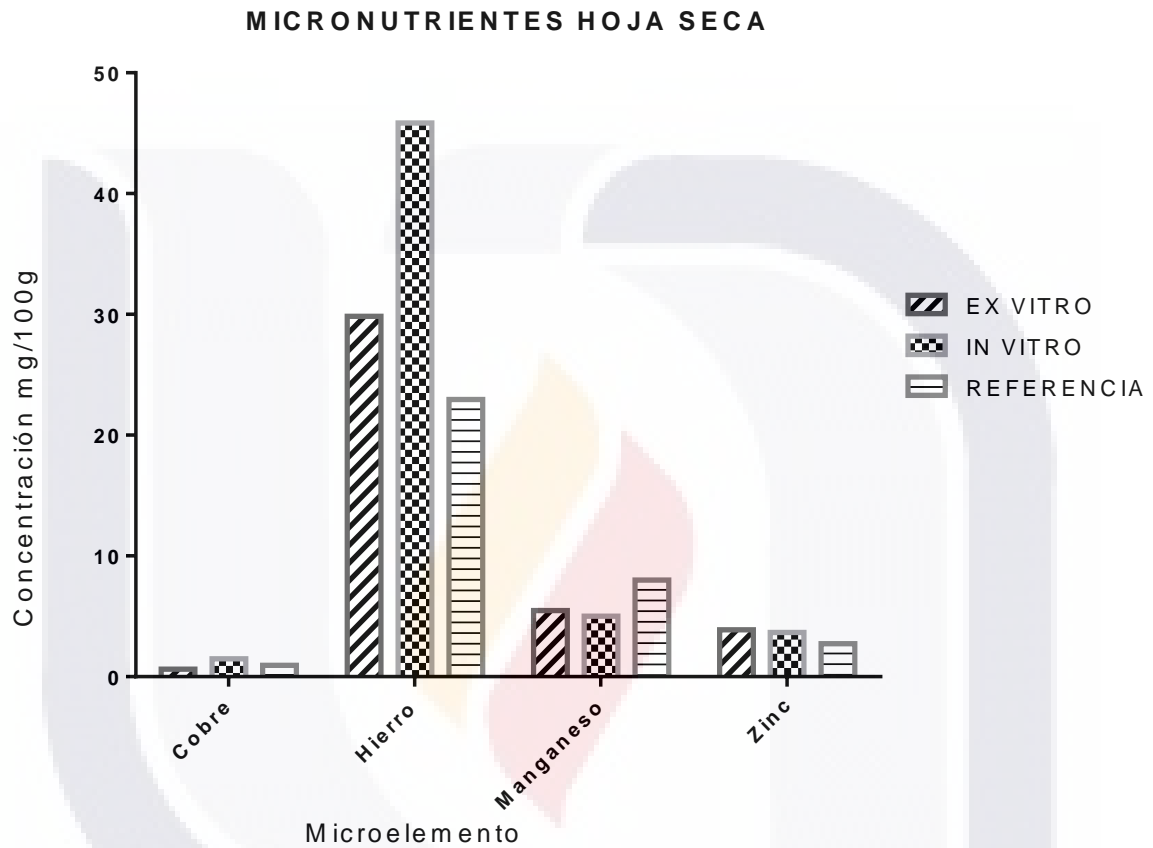
Al valor de la media se le añade la desviación estándar con análisis respectivo con una prueba de t-student de muestra *ex vitro* y valores de referencia mostrando el valor p, con un 95% de confianza. N=3.

La figura 14 corresponde a la gráfica del análisis de porcentaje de macronutrientes presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura. La cantidad energética se representa en kilocalorías.



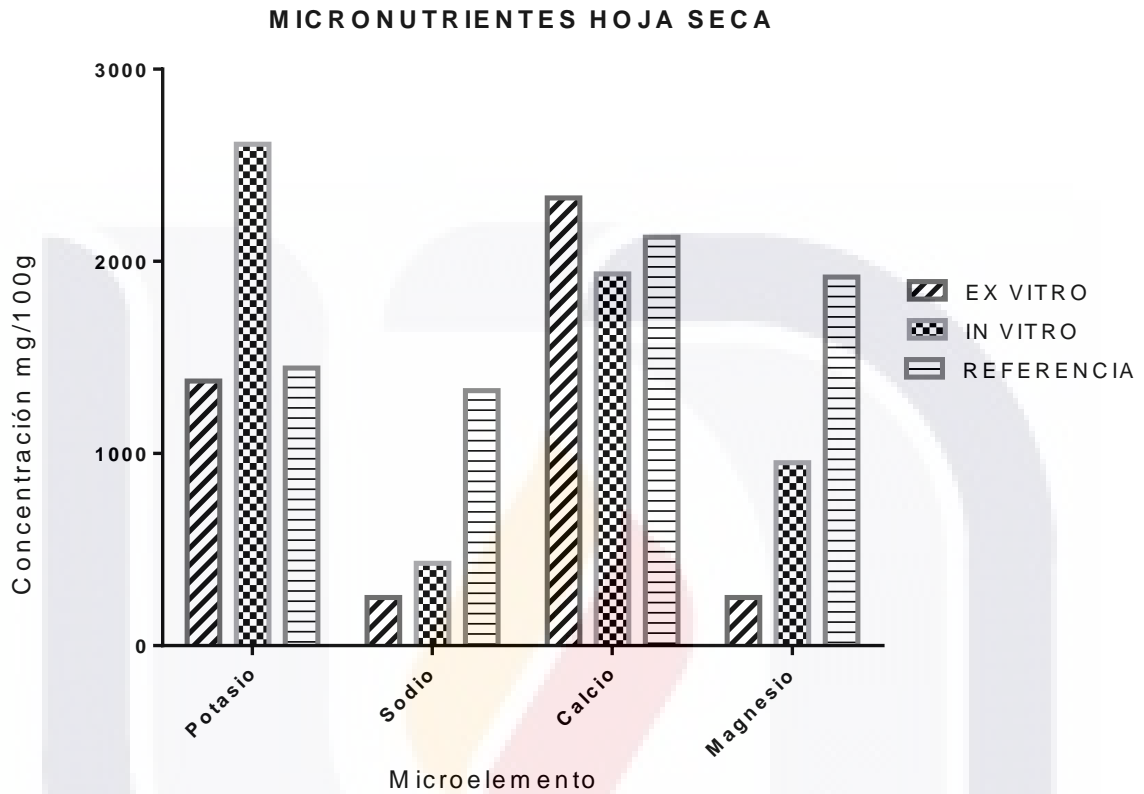
**Figura 14.** Porcentaje de macronutrientes presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura. La cantidad energética se representa en kilocalorías.

La figura 15 corresponde a la gráfica del análisis de micronutrientes; Cu, Fe, Mn y Zn, presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura.



**Figura 15.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura. La concentración de microelementos se presenta en mg por cada 100g.

La figura 16 corresponde a la gráfica del análisis de micronutrientes; K, Na, Ca y Mg, presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura.



**Figura 16.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura. La concentración de microelementos se presenta en mg por cada 100g.



En el análisis bromatológico de macronutrientes para hojas frescas, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las hojas *in vitro* y *ex vitro* en los elementos analizados (tabla 12) con 95% de nivel de confianza. Y en la tabla 13 se muestran los resultados del análisis de micronutrientes para hojas frescas, no existe diferencia significativa entre las hojas *in vitro* y *ex vitro* en los elementos analizados con un nivel del 95% de confianza.

**Tabla 12.** Reporte del análisis bromatológico de macronutrientes de hojas frescas de moringa; *ex vitro*, *in vitro* y referencia por cada 100 g.

<b>ELEMENTO</b>	<b>EX VITRO</b>		<b>IN VITRO</b>		<b>USDA</b>
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA
<b>Materia seca %</b>	78.3	5.33	76.47	0.41	78.66
<b>Humedad %</b>	21.7	5.33	23.52	0.41	21.34
<b>Proteína Cruda %</b>	6.00286	1.794	5.45	1.27	9.4
<b>Cenizas %</b>	2.64219	0.67	2.98	0.10	2.26
<b>Grasa %</b>	1.91586	0.60	2.61	0.69	1.4
<b>Fibra Cruda %</b>	1.32129	0.57	2.37	0.42	2
<b>ELN %</b>	9.65784	2.36	10.13	1.11	8.8
<b>Energía %</b>	79.88554	20.66	85.88	4.41	64

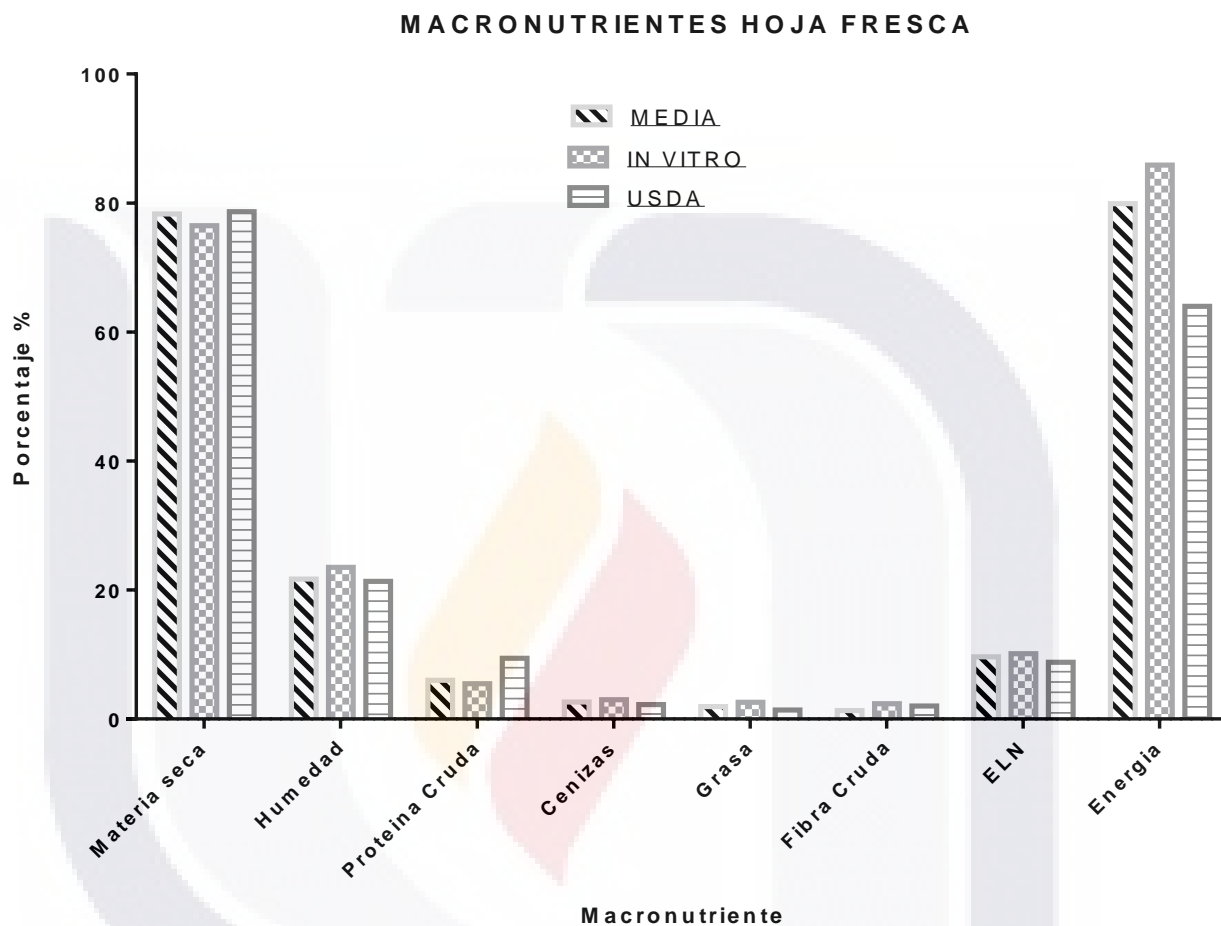
Se añade a la media el valor de la desviación estándar n= 3.

**Tabla 13.** Reporte del análisis bromatológico de micronutrientes hojas frescas de moringa; *ex vitro*, *in vitro* y referencia por cada 100 g

<b>MINERALES</b>	<b>EX VITRO</b>		<b>IN VITRO</b>		<b>USDA</b>
	MEDIA	SD	MEDIA	SD	MEDIA
Cobre mg	0.13	0.039	0.35	0.422	0.1
Hierro mg	5.56	3.51	10.72	11.80	4
Manganeso mg	1.21	0.488	1.18	0.38	1.06
Zinc mg	0.91	0.84	0.86	0.49	0.6
Potasio mg	308.60	127.51	614.74	87.76	337
Sodio mg	58.94	64.20	100.58	55.81	9
Calcio mg	531.34	304.092	457.58	224.29	185
Magnesio mg	46.63	28.75	225.43	140.91	42

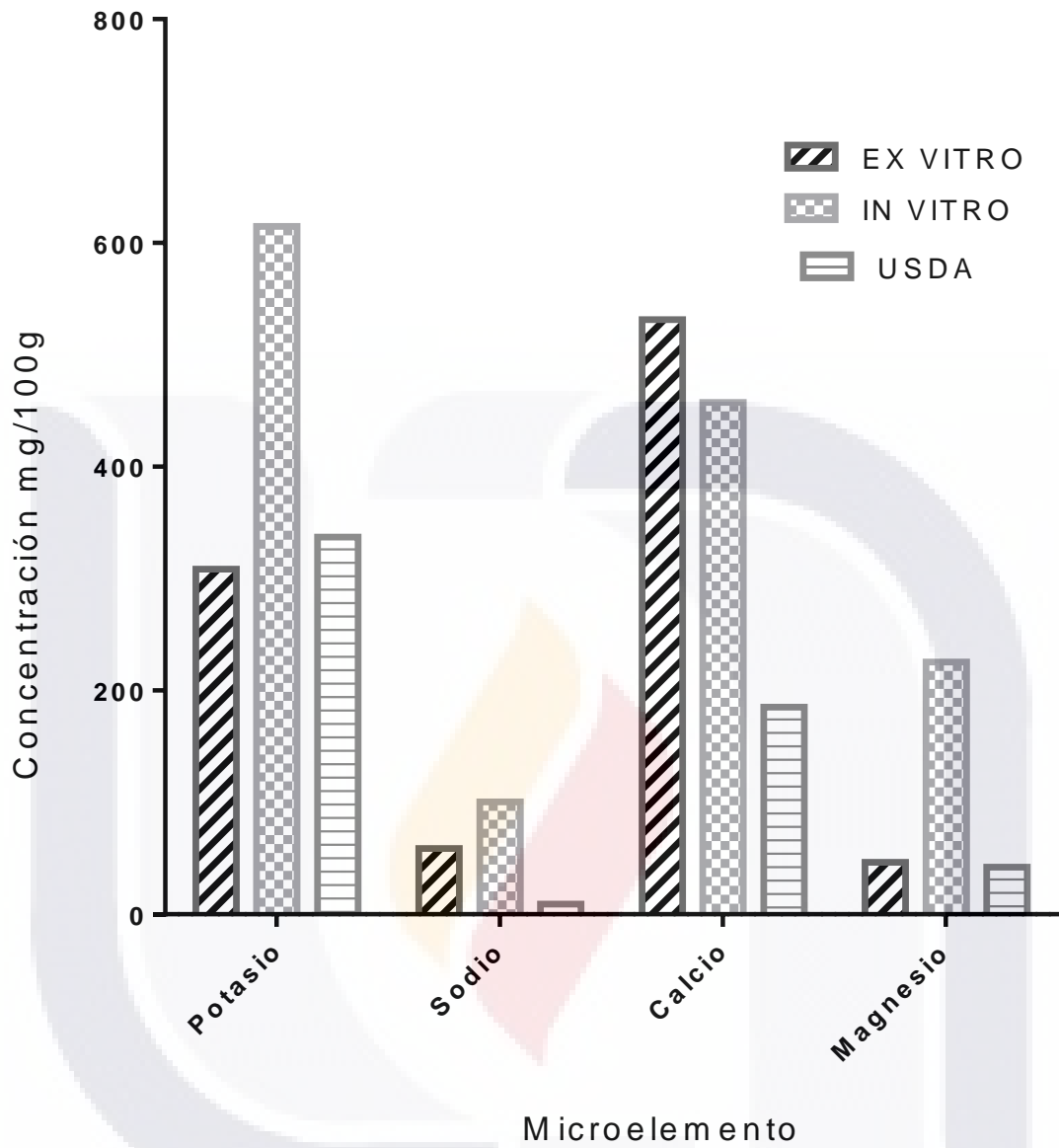
Se le añade a la media el valor de la desviación estándar n= 3.

En la siguiente figura 17 corresponde a la gráfica del análisis de porcentaje de macronutrientes presentes en hojas frescas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y el reporte del Departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA). Y las gráficas del análisis de micronutrientes se muestra en las figuras 18 y 19.



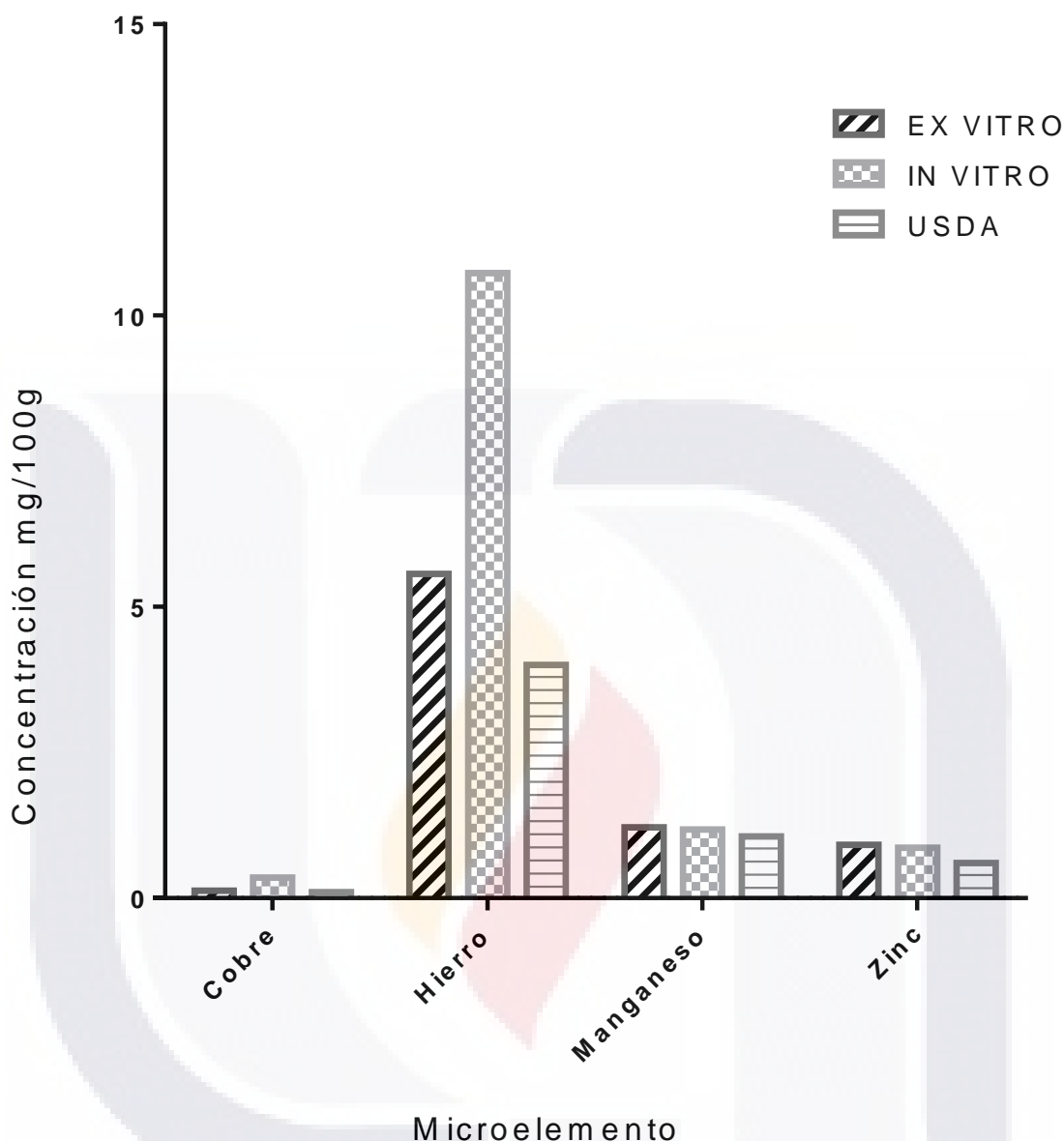
**Figura 17.** Porcentaje de macronutrientes presentes en hojas secas de moringa, *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura. La cantidad energética se representa en kilocalorías.

MICRONUTRIENTES HOJA FRESCA



**Figura 18.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas frescas de moringa, K, Na, Ca, Mg ex vitro, in vitro y la referencia reportada en la literatura. La concentración se reporta en mg por cada 100g de muestra fresca.

MICRONUTRIENTES HOJA FRESCA



**Figura 19.** Porcentaje de micronutrientes presentes en hojas frescas de moringa, Cu, Fe, Mn y Zn *ex vitro*, *in vitro* y la referencia reportada en la literatura. La concentración de micronutrientes se muestra en mg por cada 100g.

Debido al alto aporte de vitaminas y minerales, a moringa se le comparan con otros alimentos en la tabla 14 se muestra el contenido de nutrientes en hojas frescas y secas comparándolo con ciertos alimentos ricos igualmente en ciertos elementos, como proteínas, hierro, manganeso, zinc, potasio, calcio y magnesio y su comparación tanto en hojas secas como en hojas frescas con moringa.

	Moringa hojas secas	Moringa hojas frescas	Leche vaca	Carne de res	Espinacas	Brócoli	Chícharos	Plátano	Hojas de berza fresca	Almendras
<b>Proteína (g)</b>	28	6	3.1	21						
<b>Hierro (mg)</b>	30	6.8		99	2.71					
<b>Manganeso (mg)</b>	5.4	1.21				0.395				
<b>Zinc (mg)</b>	3.8	0.91					1.24			
<b>Potasio (mg)</b>	1377	308						417		
<b>Calcio (mg)</b>	2330	531	101	101					201	
<b>Magnesio (mg)</b>	250	46								270

**Tabla 14.** Cuadro comparativo de ciertos alimentos y su máximo contenido de nutrientes contra moringa por cada 100 g de muestra de hojas secas y hojas frescas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

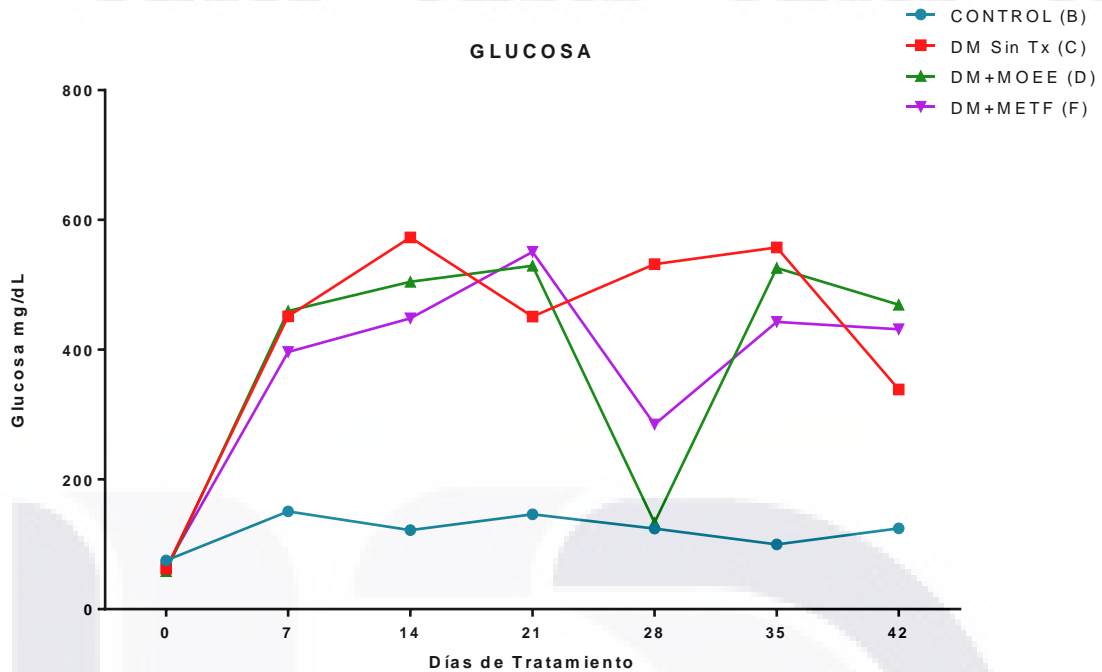


### 8.3 EXPERIMENTACIÓN CON RATAS *WISTAR* DIABETIZADAS

Las siguientes figuras de la 20 a la 25, tratarán de los resultados y análisis de varianza del primer experimento con ratas *wistar*. Se tomaron al azar 25 ratas del Bioterio y a 15 de ellas se les indujo DM con triple dosis de 55 mg/kg de STZ. A los 14 días posteriores de la inducción se inició el tratamiento correspondiente, los resultados se muestran a continuación.

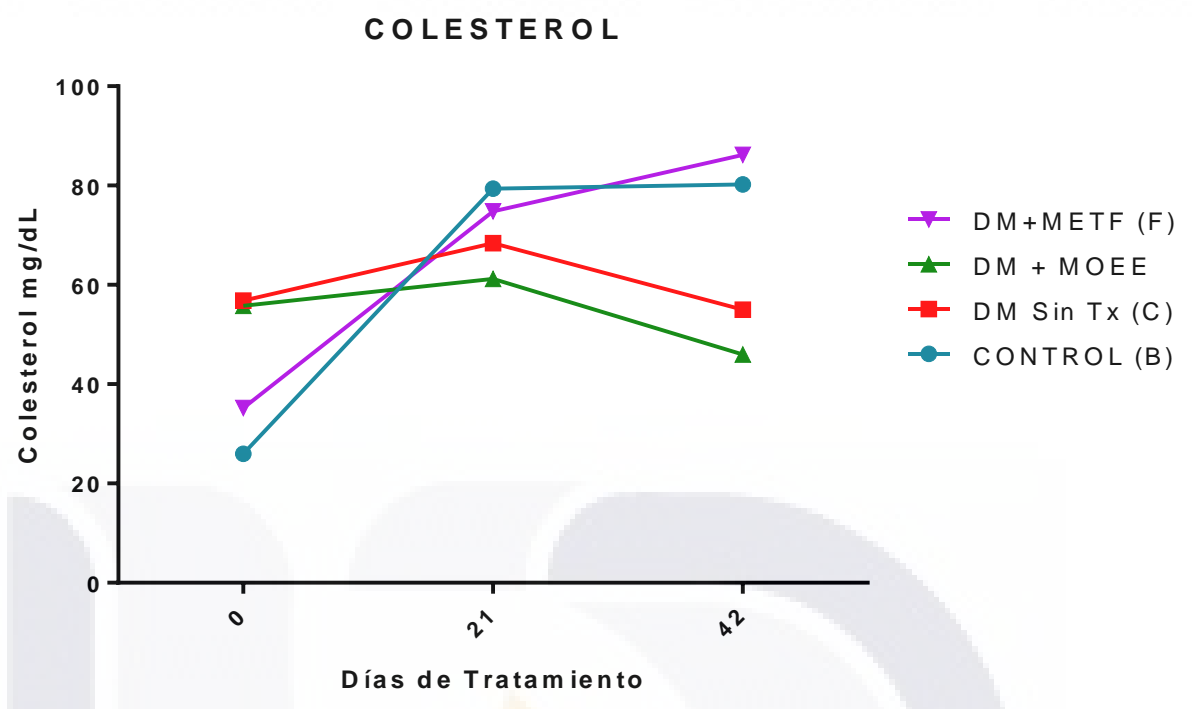
#### 8.3.1 Primer experimento en ratas *wistar*; 50 mg/kg de STZ con dos refuerzos.

Las mediciones de glucosa del primer experimento se reportan en la figura 20, se registraron las mediciones de glucosa cada 7 días hasta el sacrificio de los animales con ayuno de 12 hrs. El grupo Control (B) fueron ratas tratadas con carboximetil celulosa (vehículo), este grupo mantuvo durante todo el experimento glucemias normales oscilando entre los 50 y 100 mg/dL en ayuno. Todas las ratas inducidas con DM manifestaron un incremento drástico en la glucemia 7 días posteriores a las inyección, las cifras superaron los 400 mg/dL. Las ratas con DM +MOEE (D) tratadas con extracto etanólico de moringa, presentaron en el día 28 (segunda semana de tratamiento) una reducción en la glucemia en promedio de 130 mg/dL, posterior a esta fecha las cifras de glucosa volvieron a subir superando los 300 mg/dL y por último el grupo con DM y tratando con 350 mg/kg de metformina (Grupo F), presento una caída en el día 28 en promedio 285 mg/dL y posteriormente se elevó hasta el final del experimento.



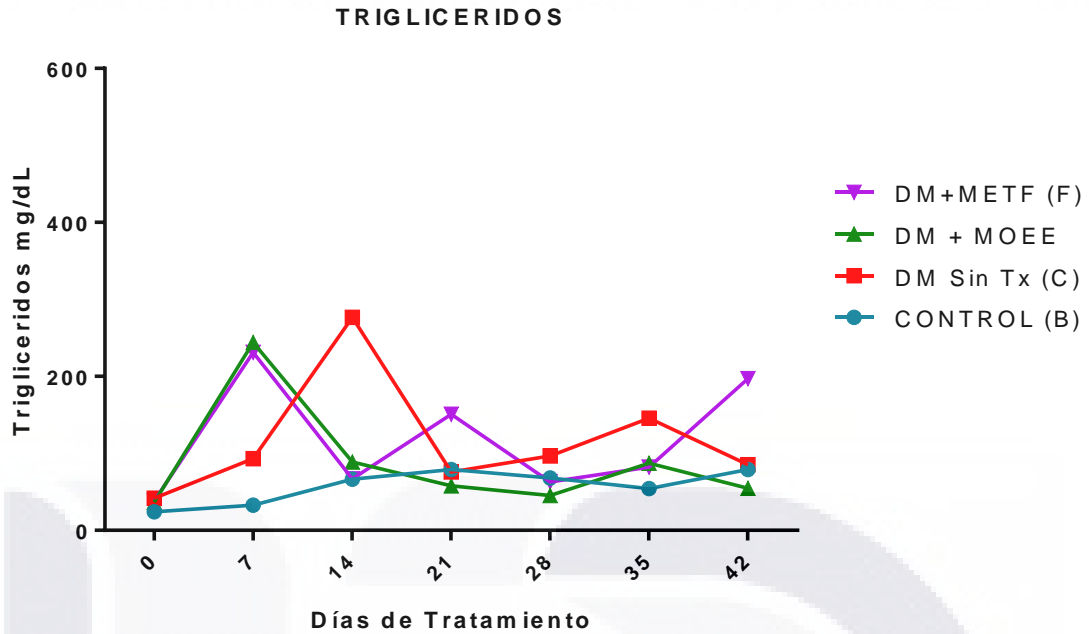
**Figura 20.** Niveles de glucosa en mg/dL por día del tratamiento del primer experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con triple dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de Moringa olifera; DM+METF (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Metformina 350 mg/kg.

La fisiopatología de DM conduce otras alteraciones metabólicas como la dislipidemia, en estos experimentos igualmente se midieron colesterol, triglicéridos e insulina. Las cifras de colesterol en ratas del primer experimento (figura 21) mostraron valores basales entre 28 y 55 mg/dL, con el transcurso de la enfermedad en el día 21 del experimento las cifras de colesterol incrementaron, oscilando entre 60 y 80 mg/dL, se puede ver una ligera disminución de estas cifras para el día 42 en el grupo (D) Extracto de moringa. Se observó que las ratas tratadas con metformina no redujeron las cifras, si no tendieron a incrementarse al paso de los días.



**Figura 21.** Niveles de colesterol en mg/dL por día del tratamiento del primer experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con triple dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+METF (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Metformina 350 mg/kg.

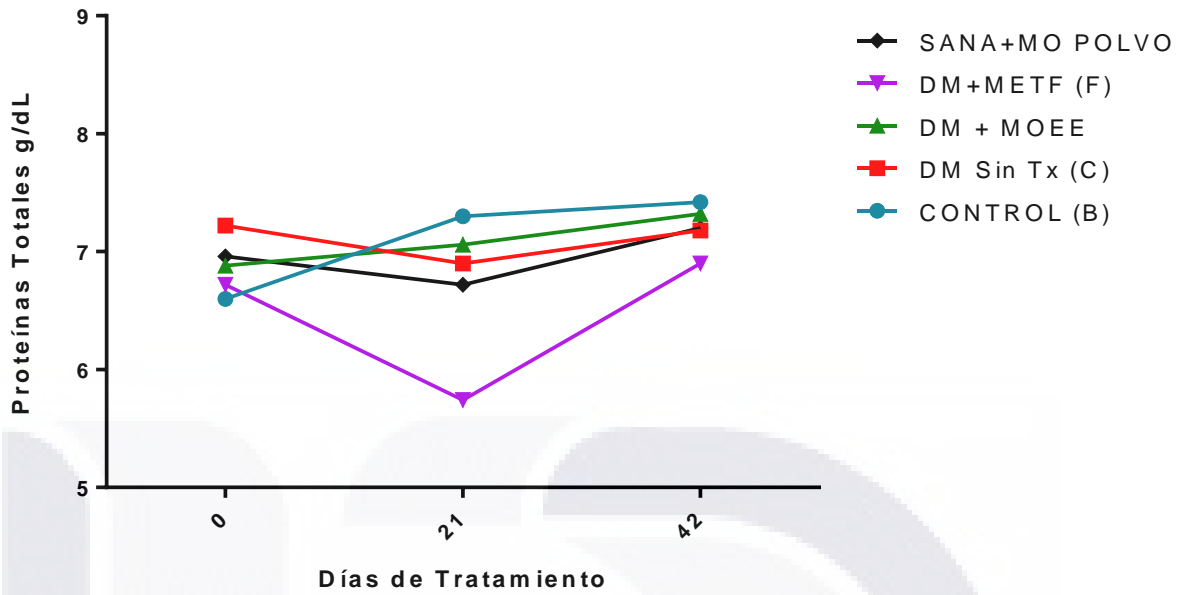
Las mediciones de triglicéridos se tomaron desde el día 0 al día 42 del experimento (figura 22) las cifras basales de las ratas oscilaron entre 30 y 60 mg/dL, las concentraciones de triglicéridos del grupo B se mantuvieron entre los 25 y 100 mg/dL, en los grupos problema después de la inducción de DM las cifras incrementaron al día 7 del experimento alrededor de 400 mg/dL y posteriormente disminuyeron. En ratas tratadas con extracto de moringa (grupo D) bajaron a la semana del tratamiento de 400 a 40 mg/dL, las ratas tratadas con metformina también desendieron sus valores hasta 100 mg/dL aunque tuvieron mayor oscilación en las cifras de triglicerios. Las ratas con DM sin tratamiento (grupo C) incrementaron sus niveles al día 14 y se mantuvieron debajo de los 150 mg/dL el resto del experimento, aunque con cifras mayores a las tratadas con moringa.



**Figura 22.** Niveles de trigliceridos en mg/dL por día del tratamiento del primer experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con triple dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+METF (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Metformina 350 mg/kg.

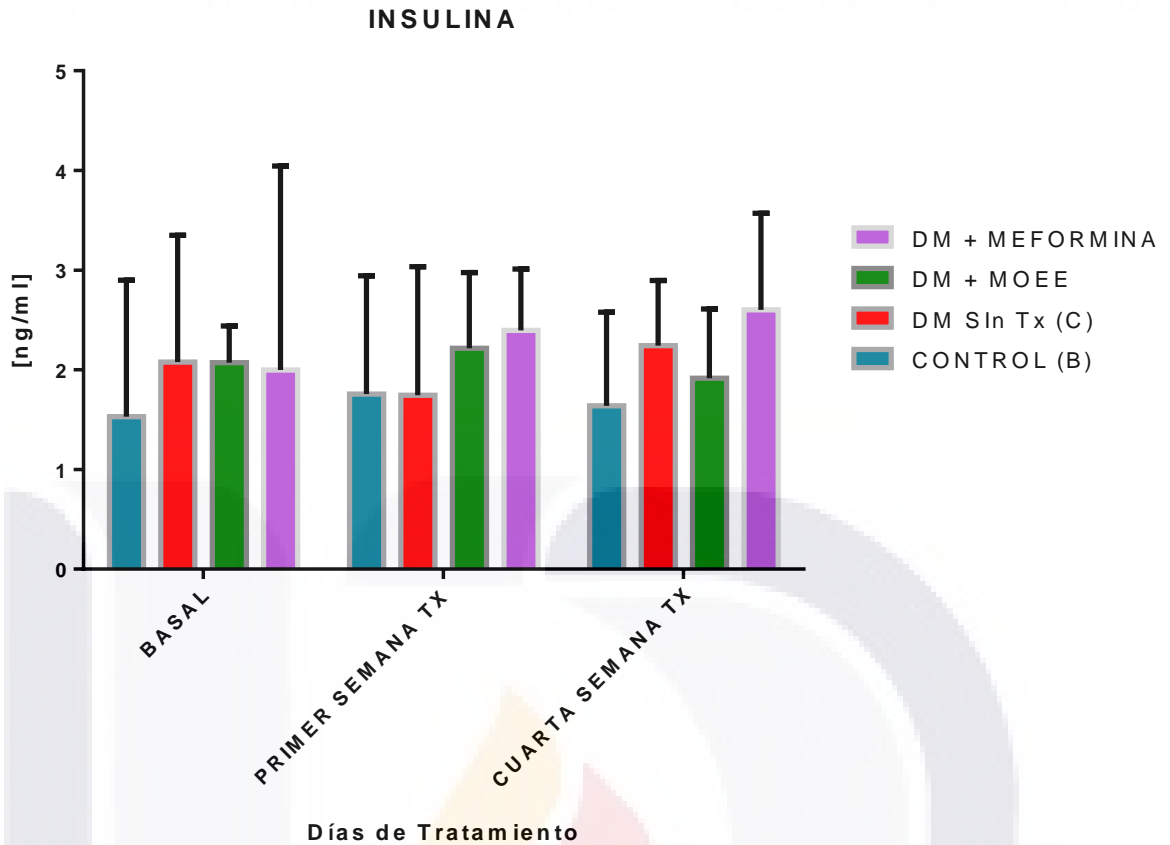
En la figura 23, se presentan los valores de la concentración de proteínas totales en suero, se correlacionaron los grupos de ratas enfermas con el control y el grupo que no se les indujo DM y solo fue suplementado con moringa, midiendo en diferentes tiempos la concentración de proteína total sérica. El grupo control mantuvo sus niveles de proteína entre 6.4 y 7.7 g/dL, el grupo con DM sin tratamiento mantuvieron sus cifras entre los 6.8 y 7.8 g/dL durante todo el experimento. Las ratas con DM con tratamiento de extracto de moringa mostraron un ligero incremento de 6.7 hasta 8 g/dL hasta el final del ensayo. Las ratas del grupo tratadas con metformina al día 21 del experimento mostraron valores bajos de 5.3 g/dL comparadas con el control y al final del experimento 5.9 g/dL. El grupo sin DM suplementado con moringa durante 28 días mostraron mejores concentraciones de proteínas totales al final entre los 7.5 y 8.5 g/dL. Se puede ver en la imagen 22 que las ratas sin DM suplementadas con Moringa presentaron mejores cifras de proteínas totales que las ratas tratadas con metformina.

PROTEÍNAS TOTALES



**Figura 23.** Niveles de proteína en g/dL por día del tratamiento del primer experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con triple dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+METF (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Metformina 350 mg/kg; SANA+MO POLVO ratas sin Diabetes Mellitus suplementadas con 300 mg/kg de Moringa oleifera.

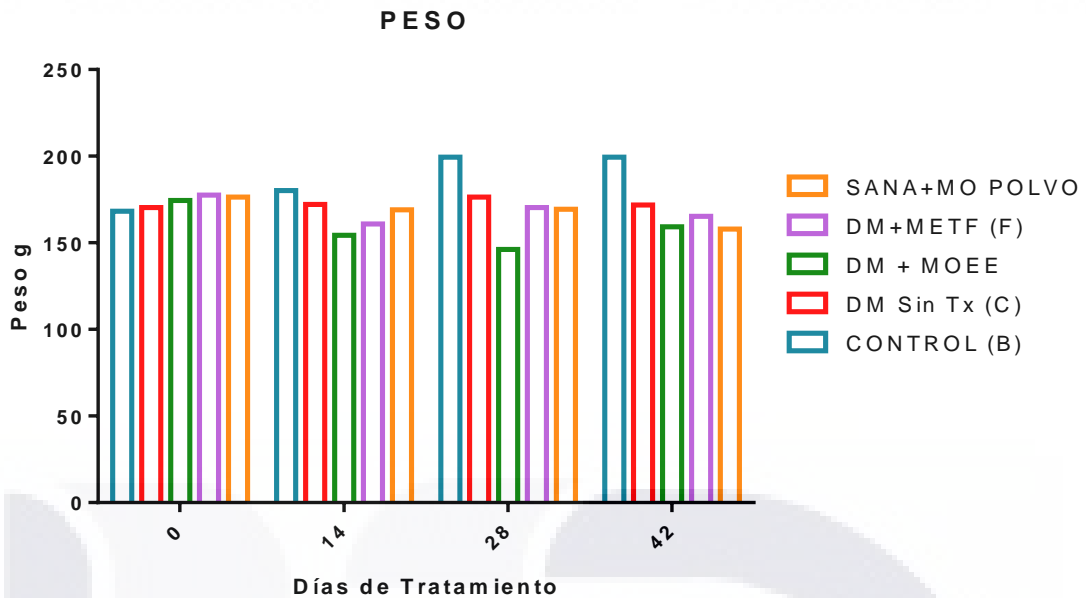
Se midieron las concentraciones de insulina en suero de las ratas control y problema (figura 24) por un método enzimático ELISA, se le añade a la media su desviación estándar. Los niveles basales de insulina en las ratas oscilaron entre 1.4 y 2.4 ng/mL, las ratas control mantuvieron sus cifras durante todo el experimento. Las ratas con DM sin tratamiento presentaron niveles muy parecidos de insulina a las ratas control. Las ratas tratadas con extracto de moringa incrementaron ligeramente sus cifras de insulina en la primera semana de tratamiento y se mantuvieron estas cifras durante todo el experimento. Las ratas del grupo con metformina incrementan ligeramente las cifras de insulina al paso de los días del experimento.



**Figura 24.** Niveles de concentración de insulina en ng/mL por día del tratamiento del primer experimento, Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con triple dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de Moringa oleifera; DM+METF (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Metformina 350 mg/kg; SANA+MO POLVO ratas sin Diabetes Mellitus suplementadas con 300 mg/kg de Moringa oleifera. A cada valor de la media se le añade la SD.

Los pesos de las ratas se registraron cada semana (figura 25) los pesos al día cero oscilaban entre 160 y 180 g, a las ratas que se les indujo DM registraron menor peso en comparación con las ratas control. Las ratas control iniciaron con un peso de 166 en promedio y terminaron el experimento con 207 g. Las ratas con DM sin tratamiento mantuvieron el peso en 170 en promedio. Las ratas del grupo tratadas con extracto de moringa iniciaron con el experimento con 173 g y lo terminaron con 158 g. las ratas tratadas con metformina iniciaron con un promedio de 173 g y terminaron el ensayo con 164 g. Las ratas sin DM suplementadas con hojas secas de moringa al día 42 pesaban entre 140 y 180 g.

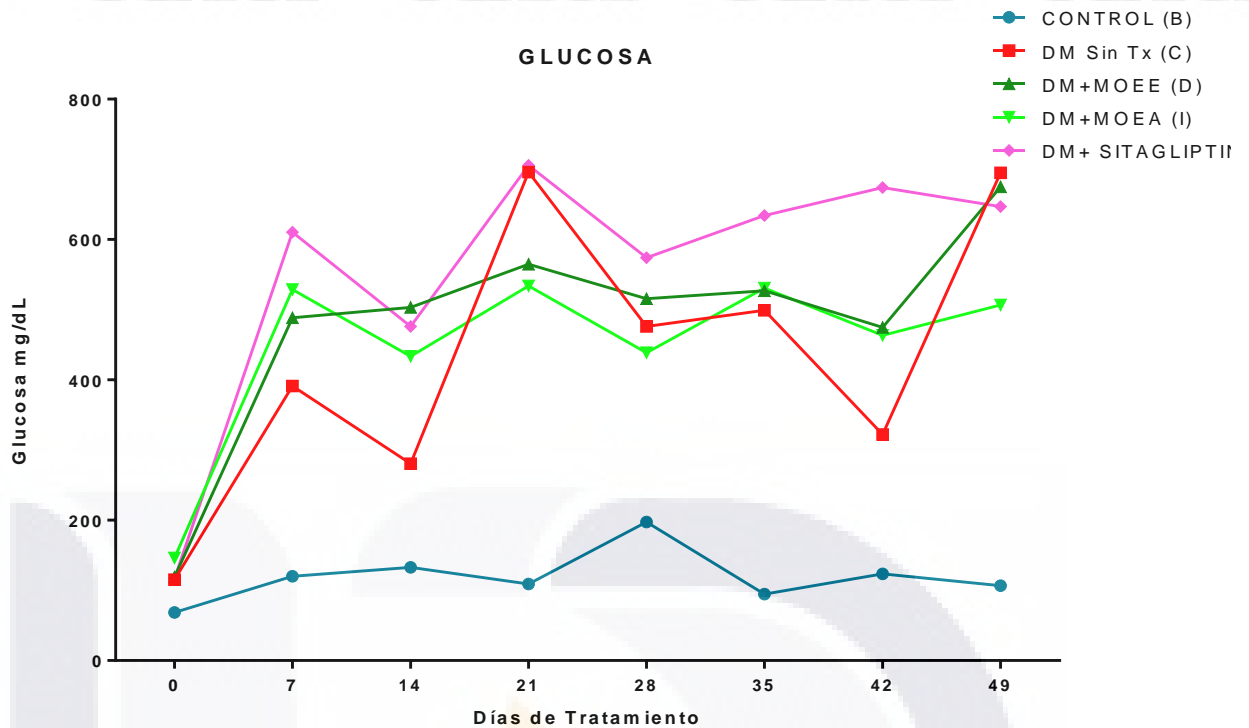




**Figura 25.** Pesos en gramos de las ratas por día del tratamiento del primer experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con triple dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de *Moringa olifera*; DM+METF (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Metformina 350 mg/kg; SANA+MO POLVO ratas sin Diabetes Mellitus suplementadas con 300 mg/kg de *Moringa oleifera*.

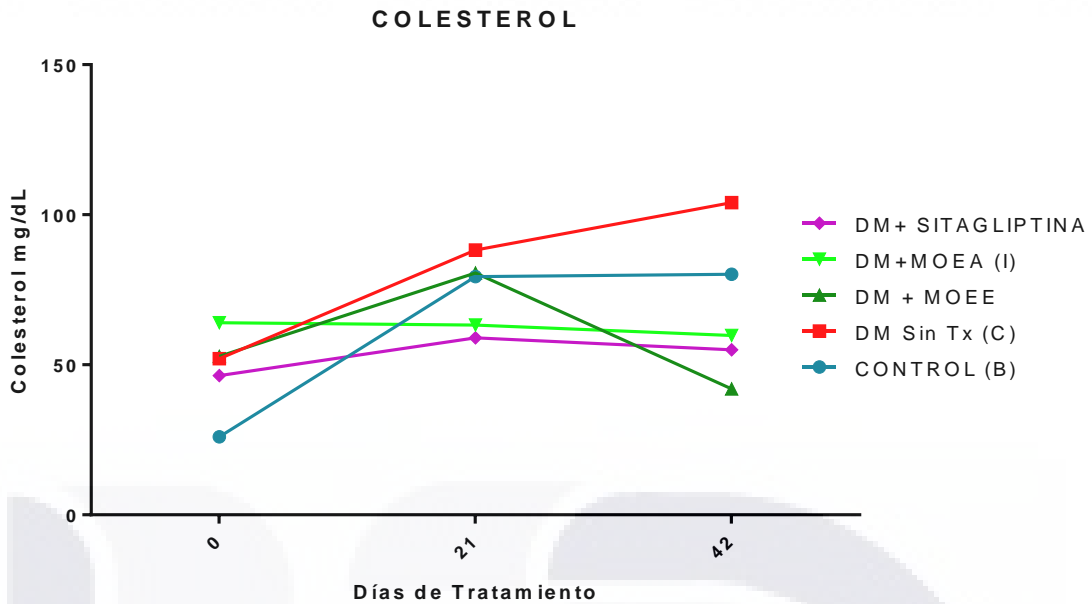
### 8.3.2 Segundo experimento en ratas *Wistar*; 50 mg/kg de STZ y un refuerzo

En las figuras de la 26 a la 30 se muestran los resultados del segundo experimento en ratas. La figura 26 corresponde a las mediciones de glucosa, las cifras del grupo control, oscilan entre 50 y 150 mg/dL, este grupo mantuvo las cifras durante todo el tiempo del experimento, mientras que el resto de los grupos problema presentaron variaciones. El grupo con DM sin tratamiento presentó picos en la glucemia muy drásticos posteriores a la inducción de la enfermedad, incrementos hasta casi los 600 mg/dL para el día 21, reducciones en el día 35 y 42 de 400 y 350 mg/dL respectivamente después incrementaron superando los 600 mg/dL, en el día 49 del experimento. Los grupos con DM tratados con extracto etanólico mostraron cifras de glucemia sin picos tan drásticos a comparación de las ratas que no recibieron ningún tipo de tratamiento. Las ratas tratadas con Sitagliptina, mostraron picos pronunciados y se mantuvieron a la alza durante todo el tiempo del experimento, llegando hasta los 700 mg/dL.



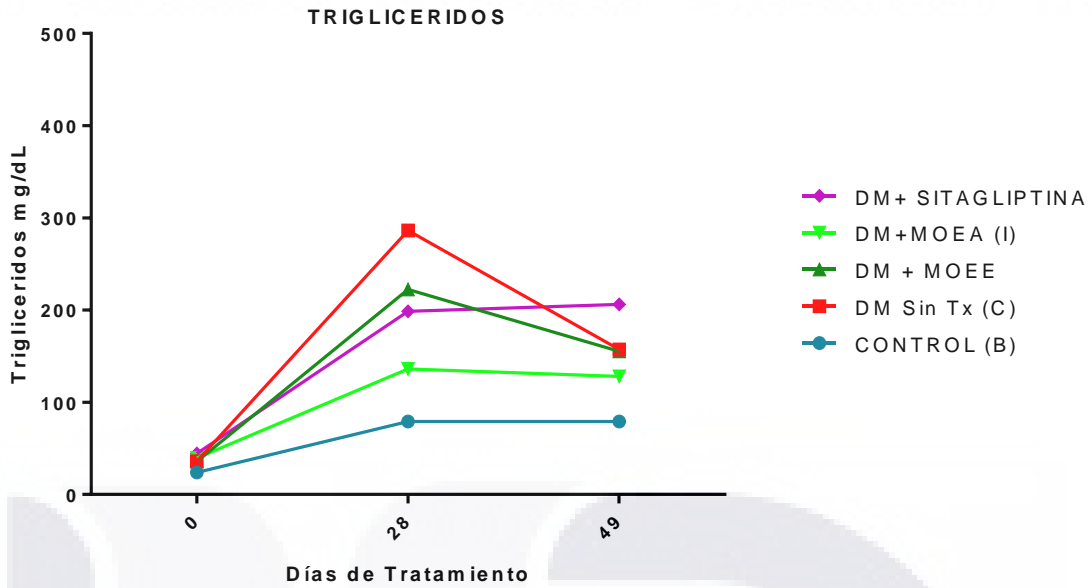
**Figura 26.** Niveles de glucosa en mg/dL por día del tratamiento del segundo experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con doble dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+SITAGLIPTINA (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Sitagliptina 100 mg/kg; DM+MOEA (I) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Acuoso de moringa.

Las mediciones de colesterol basales oscilaron entre los 30 y 60 mg/dL al día 0 (figura 27), las ratas del grupo control mantuvieron sus cifras hasta llegar a los 80 mg/dL en el día 42 del experimento. Mientras tanto las ratas con DM sin tratamiento incrementaron las cifras alrededor de 150 mg/dL tras la inducción. Las ratas tratadas con extracto de moringa incrementan sus niveles de colesterol después de la inducción entre los 70 y 150 mg/dL y en la cuarta semana de tratamiento descendieron hasta los valores basales 50 mg/dL, las ratas con extracto acuoso de moringa mantuvieron cifras alrededor de los 50 mg/dL durante todo el experimento, y las ratas tratadas con Sitagliptina mantuvieron sus niveles cerca de 50 mg/dL en la segunda semana de tratamiento y la cuarta semana.



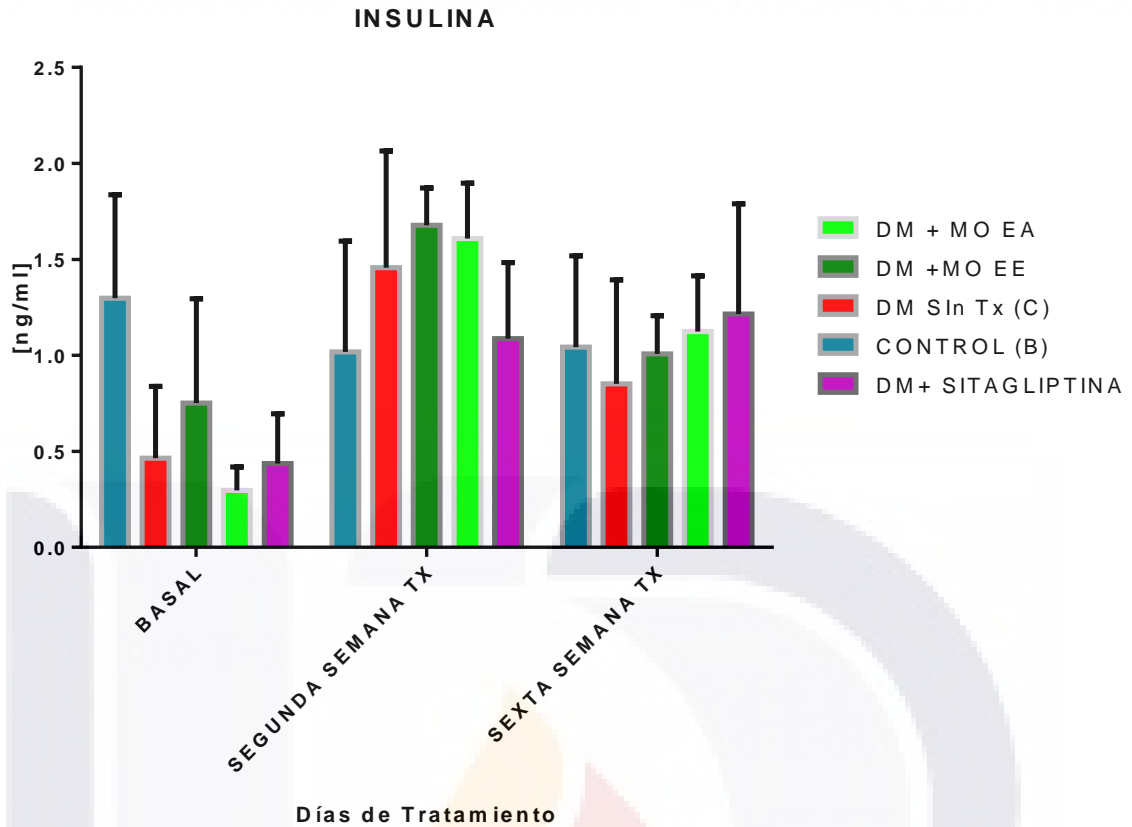
**Figura 27.** Niveles de colesterol en mg/dL por día del tratamiento tratamiento del segundo experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con doble dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de Moringa olifera; DM+SITAGLIPTINA (F) ratas con *Diabetes Mellitus* y tratadas con Sitagliptina 100 mg/kg; DM+MOEA (I) ratas con *Diabetes Mellitus* tratadas con 300 mg/kg de Extracto Acuoso de Moringa olifera.

Las ratas problema del segundo experimento incrementaron las concentraciones de triglicéridos tras la inducción de DM de los 50 hasta los casi 500 mg/dL (figura 28) las ratas control mantuvieron debajo de los 90 mg/dL sus niveles de triglicéridos, mientras que aquellas con DM sin tratamiento alcanzaron los 500 mg/dL en el día 28 y terminaron 200 mg/dL en el día 49 del ensayo. Las ratas tratadas con extracto enanolico de moringa de cifras basales incrementaron a 300 mg/dL en el día 28 y en el día 49 (segunda semana y sexta semana de tratamiento) descienden entre los 80 y 100 mg/dL, en cambio las ratas con extracto acuoso de moringa para el día 28 y 49 mantuvieron sus niveles constantes de 112 a 150 y de 112 a 170 mg/dL respectivamente.



**Figura 28.** Niveles de trigliceridos en mg/dL por día del tratamiento tratamiento del segundo experimento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con doble dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+SITAGLIPTINA (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Sitagliptina 100 mg/kg; DM+MOEA (I) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Acuoso de moringa

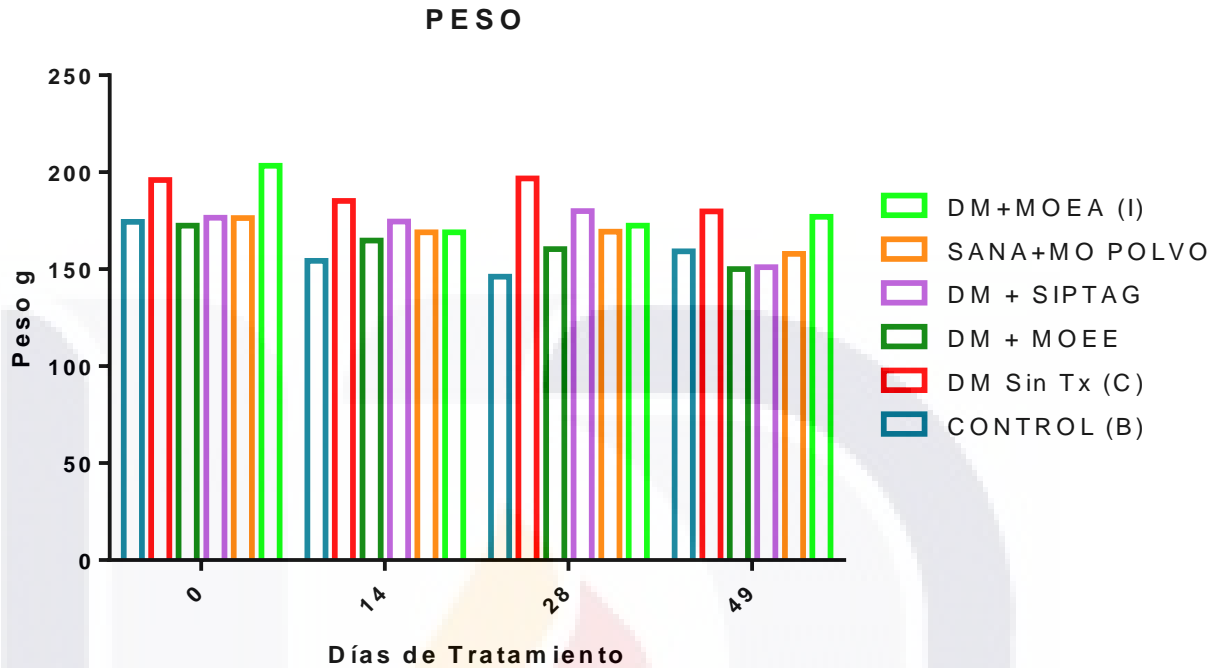
Las concentraciones de insulina basales del segundo experimento oscilaron entre 0.7 y 1.8 ng/mL para todos los tratamientos como se muestra en la figura 29 a la segunda semana de tratamiento los controles permanecieron en 1 ng/mL, mientras que la ratas con DM sin tratamiento incrementaron sus valores llegando hasta los 2.2 ng/mL y en la última semana hasta los 1.4 ng/mL, en el caso de las ratas tratadas con extracto etanólico de moringa en la segunda semana de tratamiento lleganon hasta el 1.8 ng/mL y en la ultima semana se cuantificaron hasta 1.2 ng/mL, para el caso de las ratas con extracto acuoso en la segunda semana se cuantificaron de 1.4 a 2 ng/mL y en la última semana 1.2 ng/mL. En el caso de las ratas con Sitagliptina en la segunda semana de tratamiento mantuvieron en promedio 1.0 ng/mL y en la el dia 49 1.2 ng/mL.



**Figura 29.** Niveles de concentración de Insulina en ng/mL por día del tratamiento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con doble dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+SITAGLIPTINA (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Sitagliptina 100 mg/kg; DM+MOEA (I) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Acuoso de moringa.

La correlación de peso de las ratas del segundo experimento se muestra en la figura 30. Las ratas del grupo control iniciaron el experimento con pesos oscilando entre los 195 y 150 g, mientras pasaban los días del experimento unas perdieron alrededor de 20 g y otras ganaron peso, en el día 49 registraron pesos entre los 140 y 180 g de peso, para las ratas con DM sin tratamiento el día cero registraron alrededor de 200 g y terminaron el experimento con pesos entre 150 y 180 g. se puede ver como las ratas del grupo tratadas con extracto etanólico de moringa iniciaron entre 180 g y terminaron el experimento con alrededor de 140g, en cambio las que recibieron extracto acuoso de hojas de moringa iniciaron con pesos entre los 210 y lo terminaron con 170 g. Las ratas que no tenían DM y fueron

suplementadas con moringa iniciaron en 180 g y al finalizar se registró pesos de 150 g en promedio.



**Figura 30.** Relación peso y tiempo por día del tratamiento. Control (B) ratas tratadas con carboximetil celulosa; las ratas con DM fueron inducidas con doble dosis de 50 mg de STZ; DM sin Tx (C) ratas con Diabetes Mellitus sin Tratamiento o Control positivo; DM+MOEE (D) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Etanólico de moringa; DM+SITAGLIPTINA (F) ratas con Diabetes Mellitus y tratadas con Sitagliptina 100 mg/kg; DM+MOEA (I) ratas con Diabetes Mellitus tratadas con 300 mg/kg de Extracto Acuoso de moringa.



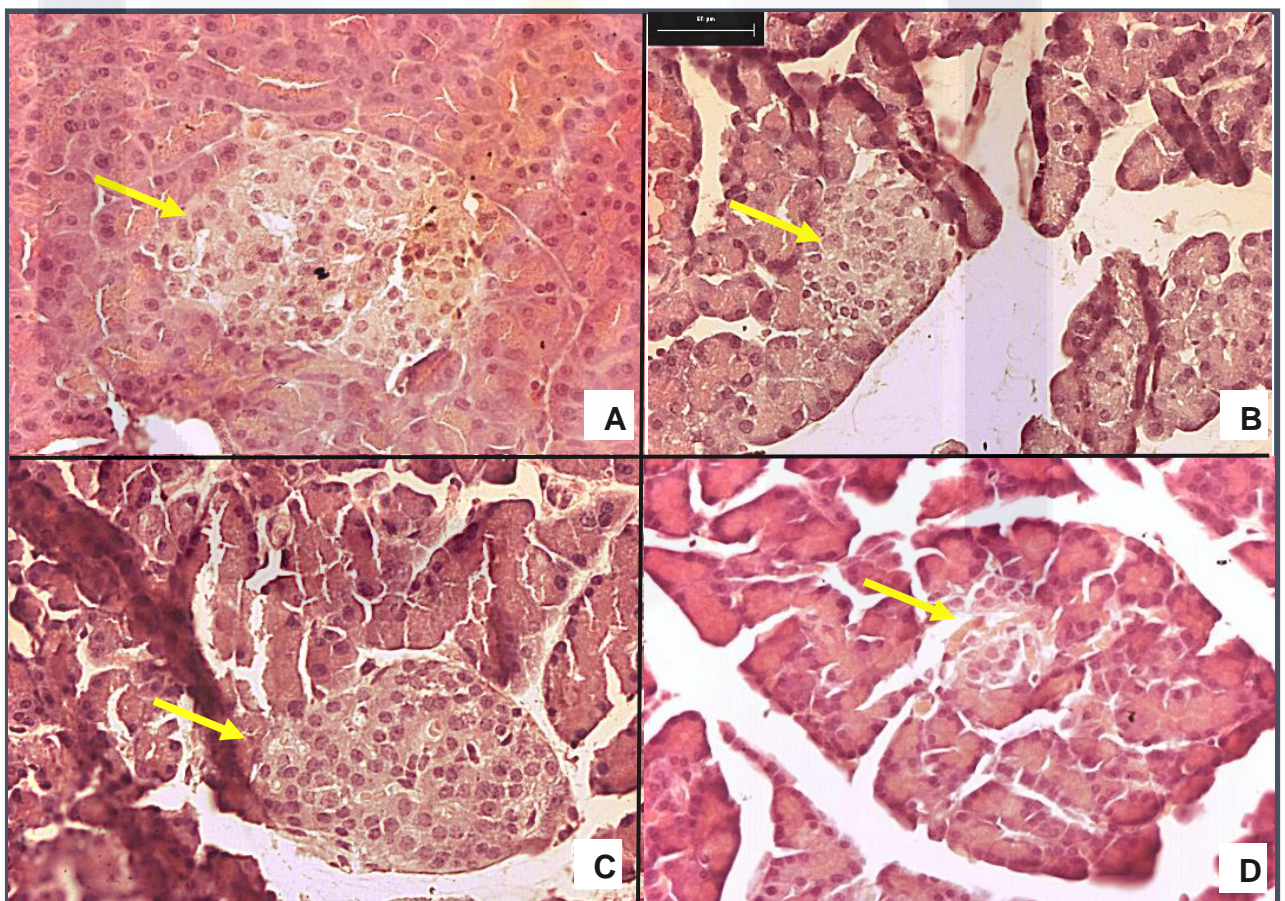
## 8.4 Histología

Los aspectos histológicos del primer experimento se muestran a continuación.

### 8.4.1 Primer experimento en ratas *wistar*; 50 mg/kg de STZ con dos refuerzos

En la figura 31 se aprecian las laminillas de cortes histológicos de páncreas bajo la tinción de hematoxilina-eosina, con aumento 20X, la figura 31A corresponde al grupo control, se encuentra señalado el islote con una flecha amarilla. La figura 31B corresponde a un islote de una rata del grupo con DM sin tratamiento, la 31C es un islote correspondiente al grupo con DM tratado con extracto etanólico de moringa y la 31D corresponde al grupo DM con Metformina.

#### 8.4.1.1 Histología de Páncreas



**Figura 31.** Histología del Páncreas de ratas del primer experimento. Corte histológico del páncreas con tinción de hematoxilina-eosina a 20X. A) ratas del Grupo control, B) ratas del Grupo con Diabetes Mellitus (DM) sin tratamiento C) Grupo de DM tratada con 300mg/kg Extracto Etanólico de moringa; D) Grupos de ratas con DM tratadas con 350 mg/kg Metfotmina

Se realizó una comparación en número y promedio de tamaño de islotes pancreáticos (tabla 15). Las ratas control presentaron mayor número de islotes pancreáticos, el promedio de islotes fue de siete islotes por laminilla, y el tamaño de éstas es aproximadamente de 7100  $\mu\text{m}^2$  y 7 islotes por laminilla siendo estas el tamaño normal, mientras que las ratas con DM sin tratamiento presentaron únicamente tres islotes por laminilla y aproximadamente 2699  $\mu\text{m}^2$  de área, parecido a los islotes encontrados de ratas tratadas con metformina con islotes de aproximadamente 3070  $\mu\text{m}^2$ , y hallazgos de un islote por laminilla. Mientras que los hallazgos de islotes de ratas tratadas con moringa fueron mayores, no en frecuencia, sin embargo, mayor área de estos alrededor de 7798  $\mu\text{m}^2$  en promedio y 3 islotes por laminilla (figura 31C).

	<b>CONTROL (B)</b>	<b>DM Sin Tx (C)</b>	<b>DM+MOEE (D)</b>	<b>DM+METF (F)</b>
Tamaño islotes ( $\mu\text{m}^2$ )	7104.5	2699.7	7798.6	3071.3
No. Islotes/laminilla	7	3	3	1

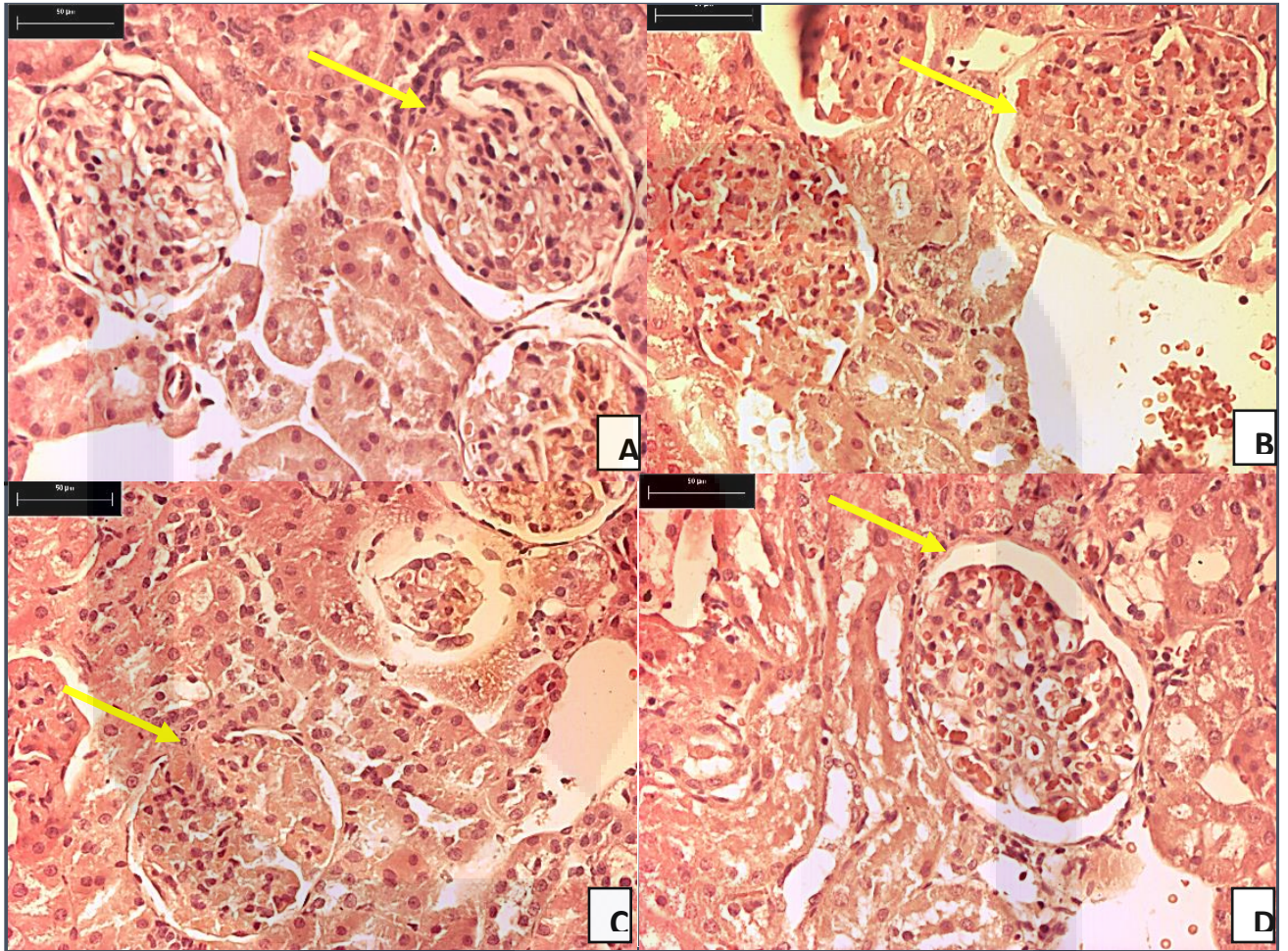
**Tabla 15.** Promedio de número de islotes por laminilla y tamaño de los islotes en los diferentes grupos tratados. B) ratas del Grupo control, C) ratas del Grupo con Diabetes Mellitus (DM) sin Tratamiento D) Grupo de DM tratada con 300mg/kg Extracto Etanólico de moringa F) DM tratadas con 350 mg/kg Metformina

#### 8.4.1.2 Histología del Riñón

La histología del riñón se realizó bajo la tinción de hematoxilina-eosina en aumento 20X (figura 32). En la figura 32A se aprecian cortes histológicos de las ratas del grupo control, la figura 32B corresponde a las ratas del grupo con DM sin tratamiento, la figura 32C al grupo de DM tratadas con 300mg/kg de extracto etanólico de moringa. La figura 32D son ratas con DM tratadas con 350 mg/kg metformina. En las ratas del grupo control (32B) se observan fácilmente las estructuras y células que componen corpúsculo renal: la cápsula de Bowman, glomérulo de Malpighi, podocitos, células mesangiales, se encuentran en buen estado, tienen un correcto espacio de filtración, no hay presencia de hemorragias internas, ni necrosis. Los túbulos contorneados renales (proximales y distales), los túbulos renales rectos y los vasos sanguíneos se aprecian correctamente. En la



figura 32B se aprecia hemorragia interna de los glomérulos, y se presenta hematuria. En la figura 32C ratas con extracto etanólico de moringa se muestra un glomero bien consevado y protegido de daño celular, para el caso de las ratas con mentfomina 32D se puede apreciar un incremento en el espacio de filtración y mayor saturación de hematíes dentro del corpuesculo.

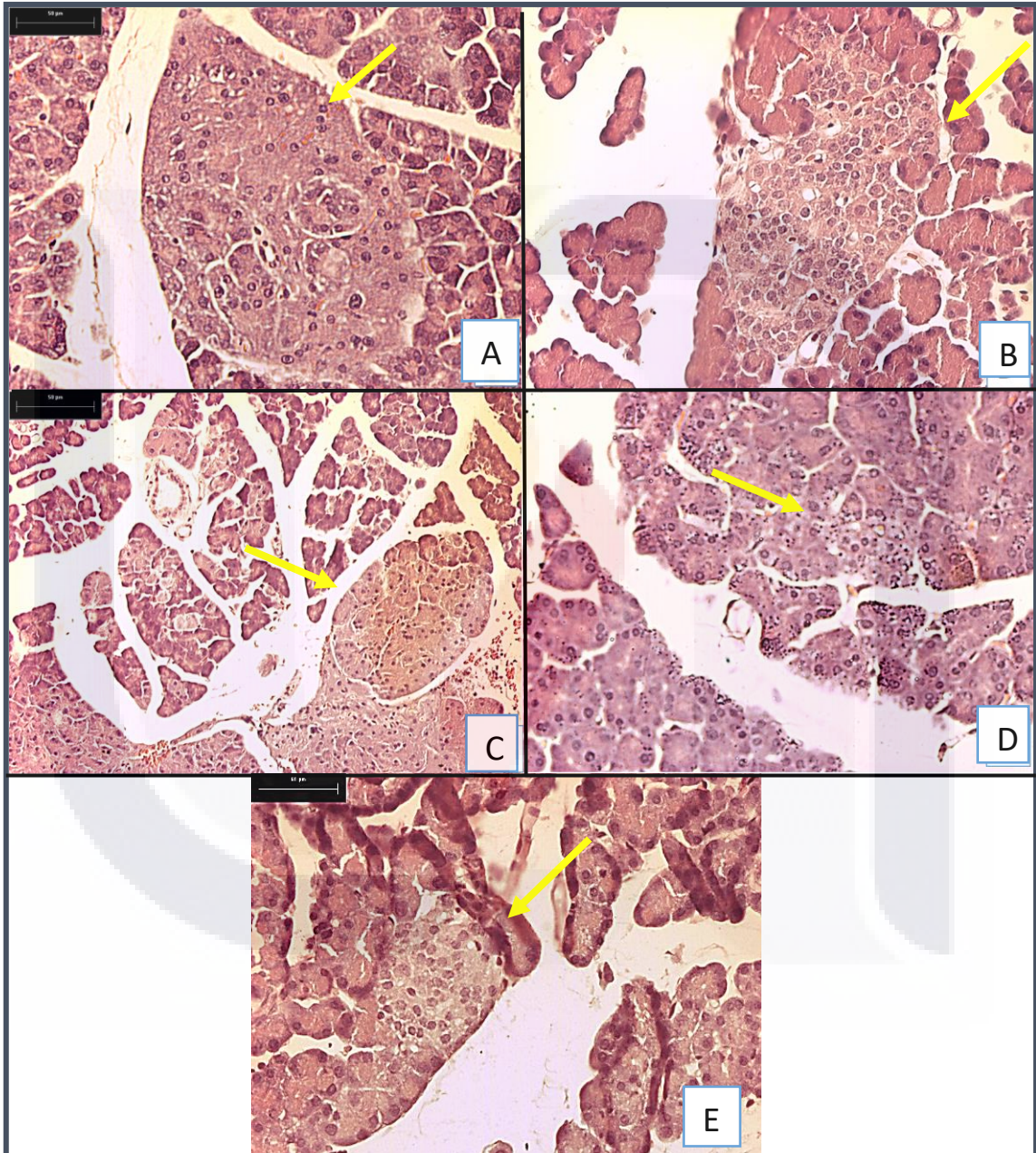


**Figura 32.** Corte histológico de corte de riñón con tinción de hematoxilina-eosina en aumento 20X A) ratas del grupo control, B) ratas del grupo con Diabetes Mellitus (DM) sin tratamiento C) grupo de DM tratada con 300mg/kg extracto etanólico de moringa, D) DM tratadas con 350 mg/kg meffotmina



## 8.4.2 Segundo experimento en ratas *wistar*; 50 mg/kg de STZ con un refuerzo

### 8.4.2.1 Histología del páncreas



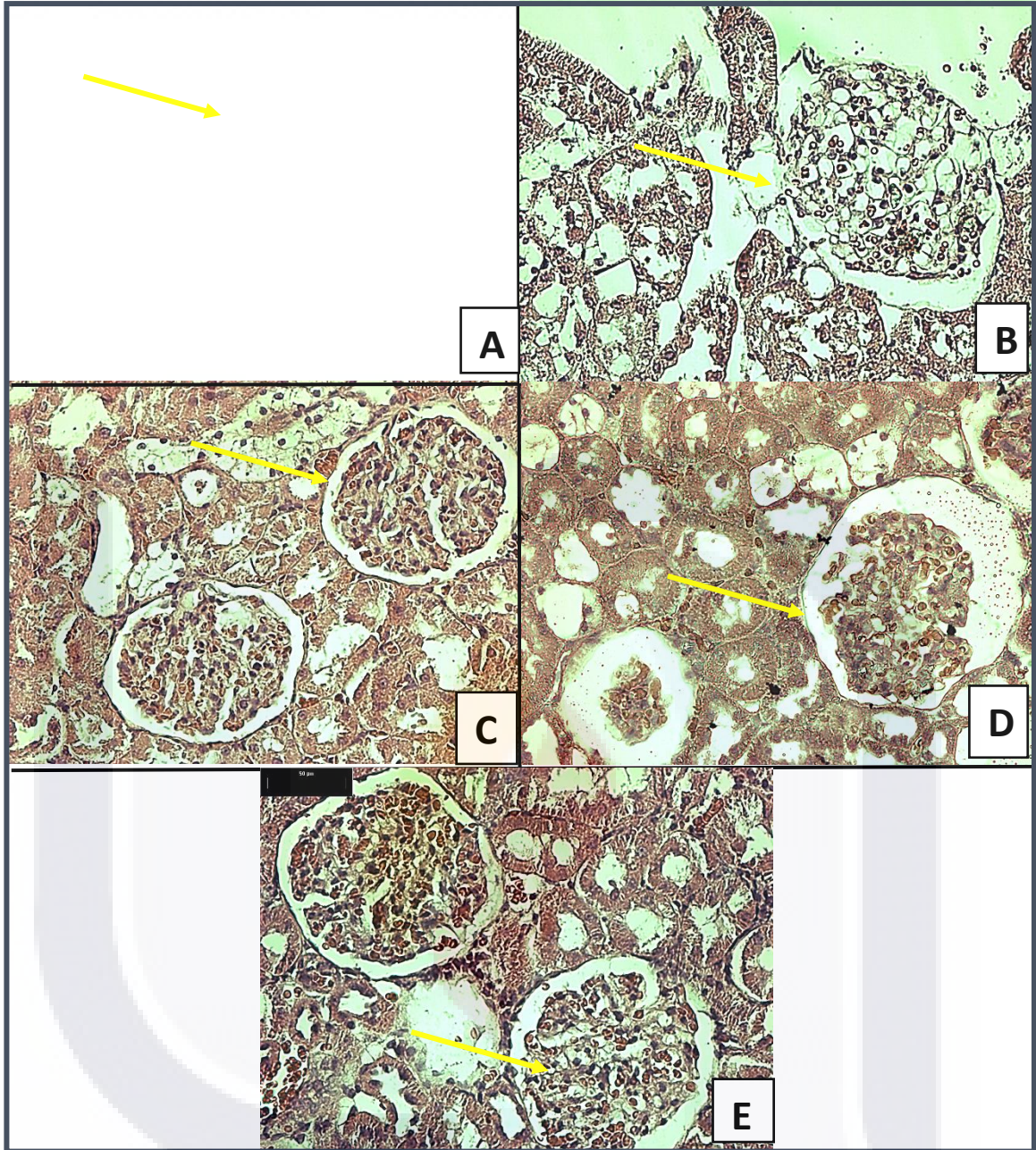
**Figura 33.** Corte histológico de páncreas de segundo experimento en ratas *wistar*; 50 mg/kg de STZ con un refuerzo. A) ratas del grupo control, B) ratas del grupo de DM tratada con 300 mg/kg extracto etanólico de moringa C) Grupo de DM tratada con 300mg/kg extracto acuoso de moringa. D) grupo de ratas con DM tratadas con 100 mg/kg Sitagliptina, E) grupo de ratas con con Diabetes Mellitus (DM) sin tratamiento.

La figura 33 fué tomada al microscopio con un aumento de 20X de cortes de páncreas la figura 33A corresponde a ratas del Grupo control, la imagen 33E, corresponde a las ratas del grupo con DM sin tratamiento, la figura 33B de ratas con DM tratada con 300mg/kg extracto etanólico de Moringa, la figura 33D pertenece a ratas con DM tratadas con 100 mg/kg sitagliptina, y en la figura 33C son del grupo con DM tratadas con 300mg/kg extracto acuoso de moringa.

#### **8.4.2.2 Histología del Riñón**

En la figura 34 se presentan una serie de imágenes tomadas de laminillas de cortes histológicos de riñón en tinción hematoxilina-eosina a un aumento de 20X de ratas del segundo experimento 50 mg/kg de STZ con un refuerzo. El recuadro 34A corresponde a una fotografía tomada de ratas control. La figura 34B pertenece a ratas con DM sin tratamiento, la figura 34C son de ratas tratadas con extracto etanólico de moringa. La figura 34D corresponde a una rata tratada con sitagliptina, y la imagen 34E corresponde a ratas con DM tratadas con extracto acuoso de moringa.





**Figura 34.** Corte histológico de riñón segundo experimentoen ratas wistar; 50 mg/kg de STZ con un refuerzo.Corte histológico de corte de riñón con tinción de hematoxilina-eosina A) ratas del grupo control, B) ratas del grupo con DM sin tratamiento C) grupo de DM tratadas con 300mg/kg extracto etanólico de moringa D) DM tratadas con 10 mg/kg sitagliptina, E) grupo de DM tratadas con 300mg/kg extracto acuoso de moringa.



## 9. DISCUSIONES

Moringa es un árbol con muchos atributos, sobresale su alto aporte nutricional, y sus diversas propiedades farmacológicas. Se tiene conocimiento de los macronutrientes y micronutrientes presentes en hojas de árboles provenientes de África, la India y Guayana Francesa, pero no hay reportes de estudios mexicanos ni resultados de hojas *in vitro*.

Olson & Alvarado-Cárdenas (2016) reportan investigaciones que se han hecho en México para conocer las localidades donde existen hallazgos de moringa como parte de la horticultura tradicional (figura 1) y en esos sitios no figura Aguascalientes, entre los sitios donde se ha encontrado moringa están; Baja California Sur, Yucatán, Veracruz, Chiapas, entre otros estados presentes en la costa del pacífico mexicano con clima tropical, estos investigadores reportan zonas del país con alta probabilidad de tener un clima adecuado para su cultivo. Moringa es un árbol caducifolio y por esta razón el CTV es una de las mejores opciones para tener ejemplares durante todo el año sin variaciones y también es una técnica muy útil para propagar plantas, se han sembrado algunos ejemplares y han respondido bien aunque también en invernadero, simulando el clima semitropical, algunos de estos ejemplares se muestran en la figura 12.

Se propagaron plantas de moringa por CTV con éxito, con pocas semillas *in vitro* sin reguladores de crecimiento, plantas suficientes para obtener material vegetal y seguir con los experimentos, éste es un factor que beneficia a la propagación gracias a que los costos disminuyen. También se tuvo éxito con la siembra *ex vitro*. Se obtuvieron 92 plántulas de moringa en total. Las semillas de moringa que se utilizaron en este estudio provenían de diferentes localidades, variaban ligeramente en tamaño (figura 5 y 6), aunque eso no modificó su comportamiento de crecimiento o su morfología.

Las semillas de moringa se propagaron (figura 7A y 7B) en condiciones axénicas y la propagación por medio de segmentos internodales y yemas apicales se realizó sin reguladores de crecimiento, lo contrario con los estudios de Saini *et al.*, (2012) que utilizaron varios reguladores de crecimiento, el tratamiento que les dio mejores resultados fue Bencil Adenina (BA) generando mayor cantidad de brotes por explante a los 15 días de inoculación, y para el enraizamiento utilizaron Ácido Indol Acético (IAA) y Ácido Indol Butírico (IBA), mientras que en este estudio

se realizó en medio MS sin hormonas de crecimiento (figura 7C y 7D). En este ensayo, las semillas germinaron a los 7 días *in vitro* como se muestra en la figura 7A y los brotes de segmentos internodales a los 6 días comenzaban a notarse. De las semillas en la primer poda solo se obtuvo un explante (figura 7A), y entre más podas más explantes generan hasta la quinta poda (figura 7B). Las plántulas se desarrollaron bien en condiciones de laboratorio (figuras 8A-8C), pero mejor en invernadero (figura 8D), engrosaron su tallo y se elongaron, detalle que en condiciones de laboratorio no ocurrió, el clima influyó directamente sobre el crecimiento del árbol. En la figura 9, se muestra una gráfica que muestra el porcentaje de supervivencia de plantas aclimatadas. Por otro lado la germinación de moringa en susstrato fue efectiva (figura 10A y 10B), aunque solo se obtuvo una planta por semilla a comparación de CTV. También esto se puede observar en la figura 11, la germinación incrementó en condiciones de laboratorio con temperatura  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , hasta la fecha no se han encontrado reportes en la literatura que realicen una comparación de germinación en condiciones de laboratorio y condiciones de invernadero.

Los análisis bromatológicos son de gran importancia en la industria alimentaria, puesto que el individuo desea conocer el contenido nutrimental de lo que va a ingerir. Moringa no solo se considera una planta con muchas propiedades farmacológicas, si no también se considera un alimento por su alto contenido de nutrientes. Es importante destacar que no existen hasta la fecha reportes científicos de análisis bromatológicos de moringa realizados en México, existen reportes bromatológicos de moringa de otros países como Guatemala (Alfaro, 2008), en Ghana, África (Glover-Amengor & Mensah, 2012) por mencionar algunos. Aunque en México existen algunos productores comerciales de moringa, en su página de internet reportan estudios bromatológicos completos, de minerales, vitaminas A y C y análisis de grasas. En este estudio de propagación de moringa *in vitro* y *ex vitro* se realizaron los análisis bromatológicos completos de macronutrientes y micronutrientes de hojas secas y frescas de moringa (figura 12 y 13), cultivadas y aclimatadas en la ciudad de Aguascalientes, México.

El contenido de nutrientes en los alimentos puede tener ciertas variabilidades, según el análisis, la fecha de cosecha, los métodos de recolección, secado, digestión, métodos analíticos, localidad, temporada del año entre otros. Algunos alimentos como los que se muestran en la tabla 14, se destacan por su alto

contenido en nutrientes, con la información obtenida de moringa se realizó una comparación con la literatura encontrada para hojas secas y en la comparación de hojas frescas se hizo con los análisis bromatológicos de United States Department of Agriculture (USDA)

Algunos nutrientes, como Calcio (Ca) y Hierro (Fe) se encuentran muy conservados, las cantidades son muy similares en estudios de diferentes países (tabla 2); en Guatemala, Alfaro *et al.*, (2008), reportes Africanos, estudios realizados por diversos investigadores; Melanie Broin *et al.*, (2012); Glover-Amengor & Mensah (2012); Moyo (2014); de Haití Leone (2015), y en Sri Lanka Asia del sur, Liyanage *et al.*, (2014) y los resultados obtenidos en este experimento superan las cifras reportadas para Calcio como se muestra en la tabla 12, en este estudio se obtuvieron 2300 mg por cada 100 g de hoja seca pulverizada *ex vitro* de moringa y en reportes de dichos investigadores el Calcio oscila entre 1500 y 2000 mg/100g (tabla 2) de hoja seca. El Hierro en estudios de los investigadores ya mencionados los valores oscilan entre 22.9 mg/100 g (tabla 10) y en el estudio para hojas *ex vitro* e *in vitro* de muestra seca fue de 29.8 mg/100 g y 45.85 mg/100 g (respectivamente). Por otro lado el Zinc se cuantificó entre 3.6 y 2.04 mg/100g para las hojas secas *in vitro* y *ex vitro* (tabla 11) y la media de las referencias 2.7 mg/100g (tabla 10) sin embargo, en las cuantificaciones el Magnesio, hubo diferencias en este estudio ya que obtuvieron 250 mg/100 g en hojas *ex vitro* y los reportes Africanos muestran 1919 mg/100 g de muestra seca.

Las concentraciones de minerales en las plantas se centran principalmente en la toma de elementos del suelo, los minerales que tienen movilidad y translocación son K, N, Mg, P, Cl, Na, y los inmóviles como el Ca, S, Fe, B y Cu (Vincino *et al.*, 2002), es debido a esto que algunos minerales los encontramos conservados en los análisis bromatológicos a pesar de las diferencias del suelo, países en Africa, Haití, Guatemala y México. Recientemente Gopalakrishnan *et al.*, (2016) publicó que las estaciones del año también influyen en las concentraciones de nutrientes de moringa, se ha demostrado que la vitamina A se encuentra en abundancia en la clima húmedo y cálido en verano, mientras que la vitamina C y el Fe están con más concentraciones en temporada de clima fresco-seco. La diferencia en los resultados puede atribuirse a la ubicación, el clima y los factores ambientales, puede influir de manera significativa en el contenido de nutrientes del árbol conforme a lo reportado en la literatura y los resultados obtenidos en este estudio. Vincino *et al.*, (2002) mencionan que la composición química típica de la materia seca de hojas puede ser: 60% carbohidratos, 25% proteínas, 5% lípidos y

10% minerales, gracias a esto los reportes de este estudio de hojas *in vitro* y *ex vitro* se obtuvo; cenizas (12%), grasas (8%), carbohidratos 44% y fibra 6%, proteínas oscilando entre los 28g/100 g (28%) de muestra seca y aporte calórico (360 kcal) no muestran diferencia significativa comparándolos con los de la literatura. Los resultados de este ensayo muestran diferencias para el aporte de fibra, con los resultados de la literatura, éste dependerá de las etapas fenológicas de la planta, y el momento de la cosecha.

En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados de los análisis de microelementos de hojas secas y frescas *in vitro* y *ex vitro* de moringa, según el análisis estadístico las hojas *in vitro* son significativamente más ricas en K y Na que las hojas *ex vitro*, y en potasio que las hojas de referencia. No existen diferencias significativas en el contenido de Cu, Fe, Mg, Zn, Mn y Ca de hojas *in vitro* y *ex vitro* de moringa y de hojas de referencia de moringa. Existe diferencia estadística, las hojas *ex vitro* contienen más proteínas que las hojas de la referencia y las hojas *in vitro*. No existe diferencia significativa en el contenido de macronutrientes (Cenizas, grasa y fibra) entre las hojas *in vitro* y *ex vitro* de moringa ni las hojas de referencia comparadas con las *in vitro* y *ex vitro*.

Siguiendo con el análisis de composición de alimentos en la tabla 14 se muestran comparaciones entre hojas frescas y secas de moringa y algunos alimentos. Por ejemplo el contenido de Hierro (Fe) presente en la carne de vacuno y hojas de espinacas, éstos son alimentos por excelencia ricos en hierro, en los análisis aquí reportados las hojas secas de moringa tienen 11 veces más Fe que la espinaca y 2.5 veces más Fe en hojas frescas. En el caso del calcio (Ca), Moringa por cada 100 g de hoja seca aporta 2330 mg de Ca, es decir tiene 23 veces más que 100 g de leche de vaca entera ó contiene 5 veces más Ca en hojas frescas que 100 g de leche de vaca y 100 g de carne de res. Mientras que 100 g de hojas seca pulverizada aporta 3.3 veces más potasio que 100 g de plátano, como lo menciona Alfaro (2008).

Un aspecto importante a mencionar, es que moringa es utilizada en algunas regiones del mundo donde existe alto índice de desnutrición como fuente importante de alimento, aportando principalmente proteína y como se muestra en la tabla 14, por cada 100 g de hoja seca se obtienen 28 g de proteína, con una buena calidad de aminoácidos según Moyo *et al.*, (2011) en la tabla 1, ya que las hojas de moringa contienen todos los aminoácidos esenciales y las proteínas que contienen azufre, metionina y cisteína se pueden convertir en otros aminoácidos necesarios.

Alfaro *et al.*, (2008) realizó un análisis de digestibilidad de varias partes de la planta de moringa, determinó el Índice de Eficiencia Proteica (PER), y Razón Proteica Neta (NPR). En el PER y NPR evaluaron el valor nutricional de las proteínas basadas en los cambios de peso corporal de los animales, cuando la proteína se introducía o era convertida en peso corporal, la proteína contenida tenía buena digestibilidad. Rivas-Vega (2010) demostró que la proteína de moringa tiene hasta el 89% de digestibilidad cuando fue suplementada en peces que fueron alimentados con harina de moringa.

Continuando con los minerales en el estudio aquí reportado se observó que 100 g de hoja seca aportaron 1.21 mg de Mn y 1.18 mg de Mn por 100g de hoja fresca *ex vitro* e *in vitro* respectivamente y el brócoli contiene 0.395 mg en 100 g. Mientras que dentro de los alimentos con mayor aporte de Mg están las almendras que por 100 g aportan 270 mg y moringa por 100 g de muestra seca aporta 250mg. Investigadores como Leone y *et al.*, (2015) reportan que hojas de África aportan entre 500 y 560 de Mg, y en este estudio se obtuvieron resultados de 25 mg/100 g de hojas secas *ex vitro* y 950 mg de hojas *in vitro*, las concentraciones de minerales dependerán de las propiedades del suelo, si la tierra tiene fertilizantes, movilidad y translocación de minerales, la etapa de la cosecha y la etapa fenológica de la planta como menciona Vincino *et al.*, (2002).

La DM es una enfermedad muy frecuente a nivel mundial, año con año incrementa la tasa de prevalencia, a pesar de ser una enfermedad muy estudiada y con una amplia gama de tratamientos entre alópatas, remedios herbolarios y cambio de hábitos y estilo de vida, a las personas se les sigue detectando y sus complicaciones se han convertido en una de las principales causas de muerte en México y en el mundo (Hernández, 2013; Surya *et al.*, 2014; AMD 2015). Todos los fármacos generan un nivel de toxicidad y tienen efectos secundarios, se pretende encontrar una alternativa de tratamiento para un tipo de DM que favorezca al control de la enfermedad y aminore los daños secundarios de la enfermedad, así como una menor o libre grado de toxicidad.

El experimento clínico para comprobar el supuesto efecto hipoglucemiante se hizo en dos ocasiones con dosis distintas, el primer experimento en ratas *wistar*; 50 mg/kg de STZ con dos refuerzos, se tomó el protocolo Jaiswal *et al.*, (2009) y de Gupta *et al.*, (2012) con ciertas modificaciones basadas en las observaciones de Junod *et al.*, (1969). Se incluyeron ratas hembras de edad entre 2.5 y 3 meses que



posteriormente a la inducción mantuvieron glucemias superiores a 250 mg/dL (Gupta *et al.*, 2012), las cifras normales en ayuno de glucemia en ratas hembras *Wistar* oscilan de los 50 a 180 mg/dL (Castello *et al.*, 2011). En estos experimentos se logró el 100% de la diabetización y no como lo sugiere McNeill (1999) que únicamente se diabetizan el 80%.

En este experimento las ratas del grupo C con DM no recibieron tratamiento para la enfermedad, por lo que era de esperarse que las cifras de glucosa se mantuvieran elevadas, al día 7 posterior a la inducción se incrementaron drásticamente las cifras, superando los 450 mg/dL (figura 20), diferente de los resultados de Gupta *et al.*, (2012) que lograron tras dosis única de STZ de 50 mg/kg una glucemia en ratas control de 260 mg/dL, por otro lado Jaiswal *et al.*, (2009) reportó 300 mg/dL en ayuno, tras la inducción con 55 mg/kg de STZ (tres días de inducción). En otras investigaciones Ndong *et al.*, (2007) usaron ratas Goto-Kakizaki (GK) y *Wistar* sin embargo, ese experimento se basaba en la medición aguda de la glucemia de 0 a los 120 min después de la toma con extracto de moringa y posterior a una carga glucémica, las subcepa de ratas (GK) logró cifras cercanas a los 400 mg/dL después de la carga glucémica y las ratas *Wistar* de 150 mg/dL. Las ratas Goto-Kakizaki (GK) es una subcepa de rata *Wistar* no obesos que desarrolla *Diabetes mellitus* tipo 2 en sus primeros años de vida, el modelo fue desarrollado por Goto y Kakizaki en la Universidad de Tohoku, Sendai, Japón en 1975. Cabe mencionar que ninguno de estos experimentos mencionados utilizan un protector de células beta pancreáticas como la nicotidamina (Amaya-Chávez *et al.*, 2007).

En los experimentos aquí reportados las ratas tratadas con extracto etanólico de moringa (300 mg/kg) descendieron las cifras de glucosa al día 28 del experimento al igual que las ratas con metformina (350 mg/kg) de 450 mg/dL (ambos grupos) a 130 y 250 mg/dl en promedio respectivamente, se tiene el antecedente como hipoglucemiante en dosis diferentes, misma dosis de STZ que en este estudio y tres concentraciones de extractos (100, 200 y 300 mg/kg) suministrado con 21 días de tratamiento en los estudios de Jaiswal *et al.*, (2009) las cifras iniciales llegan a 300 y al transcurso del día 21 descienden a 100 mg/dL, y comportamiento de la hipoglucemia es expuesto por Gopalakrishnan *et al.*, (2016) donde explica que; “los altos niveles de glucosa en sangre activan la glucólisis en las mitocondrias de las células beta y formas reactivas de especies de oxígeno. Esto provoca la apoptosis de las células beta, que a su vez conduce a una disminución de la secreción de insulina, hiperglucemia y, finalmente, diabetes tipo



2. Sin embargo, la apoptosis de las células beta puede ser evitada por el uso de moringa. Moringa tiene antioxidantes que se combinan con las especies reactivas de oxígeno y previenen el daño celular y otras consecuencias”.

Las hojas de moringa son una buena fuente de polifenoles probablemente estos son los causantes de la hipoglicemia, entre los polifenoles reportados están; quercetina-3-glucósido, rutim, kaempferol, glucosidos tiocarbamatos y flavonoides. Estos compuestos reprimen a los ROS quelando iones de metal y regenerando antioxidantes unidos a la membrana (Farooq *et al.*, 2001; Ndong *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2012).

En este trabajo, al momento de realizar las mediciones de glucosa en las ratas control y problema y realizar el análisis de varianza, la glucosa resultó altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) y el análisis comparativo de prueba Tukey (ANEXO 1), se encontraron diferencias significativas en los tratamientos. Si bien las glucemias de los grupos problemas no disminuyeron hasta alcanzar cifras del grupo control, en los resultados se puede apreciar una tendencia a la reducción de la glucosa en el primer experimento al día 28 (segunda semana del tratamiento) para el grupo tratado con extracto etanólico de moringa. Existen diferencias en todos los tratamientos al día 7 del experimento, es altamente significativa la diferencia al día 14 entre control y DM sin Tx y el resto de los tratamientos. No hay diferencia en el grupo control y DM con extracto de moringa al día 28.

Dado que las cifras de glucosa alcanzadas en las ratas eran muy elevadas, es probable que el daño celular ocasionado en los islotes pancreáticos fue irreversible, no lo sabemos con exactitud, puesto que no se cuentan con cortes histológicos de diferentes momentos del experimento, únicamente se cuenta con cortes hasta el final del experimento al día 42. Sin embargo, como se refleja en la figura 31 cortes histológicos de páncreas bajo la tinción de hematoxilina-eosina, la figura 31A corresponde al grupo control, que mantiene una estructura clásica de los islotes de Langerhans, las células forman pequeños islotes que bajo esta tinción se aprecian de color rosa pálido, mantienen una estructura esférica u ovalada, rodeadas por acinos pancreáticos que se aprecian de color rosa o morado más intenso. Se puede ver un citoplasma prominente con células que contienen acinos serosos centroacinares. Para poder diferenciar otro tipo de células como las células insulares es necesario realizar otro tipo de tinción como la tinción de Gomori o de inmunofluorescencia. Las células beta son pequeñas de color azul o púrpura como reporta Arenas *et al.*, (2005), en la figura 31 se encuentran señalados los islote con

una flecha amarilla. La figura 31B, corresponde a un islote de una rata del grupo con DM sin tratamiento, las ratas del grupo este grupo mostraron islotes degenerados con restos celulares, se puede apreciar la diferencia del tamaño de los islotes siendo el islote del B más pequeño en relación al control figura 31A. La figura 31C es del grupo con DM tratado con extracto etanólico de moringa, se aprecia el rejuvenecimiento de islotes pancreáticos, se conserva su estructura, aunque el tejido adyacente se encuentra lisado, existen datos similares reportados por Gupta *et al.*, (2011). La figura 31D corresponde al grupo DM con metformina, apreciamos la reducción significativa del tejido y una necrosis casi total de las células.

El número y el tamaño de los islotes están íntimamente relacionados con la producción de insulina. En la Tabla 15 se muestran los promedios del tamaño de los islotes pancreáticos por laminilla. Las ratas del grupo control presentaron mayor número de islotes pancreáticos, el promedio de islotes fué de siete por laminilla, y el tamaño de éstas era aproximadamente de  $7100 \mu\text{m}^2$  mientras que las ratas con DM sin tratamiento presentaron únicamente tres islotes por laminilla y aproximadamente  $2699 \mu\text{m}^2$  de área, el tejido se observa necrosado y lisado, parecido a los islotes encontrados de ratas tratadas con metformina (F) los islotes de aproximadamente  $3070 \mu\text{m}^2$  y uno por laminilla. Mientras que los hallazgos de ratas tratadas con extracto de moringa fueron mayores, no en frecuencia, sin embargo mayor área de estos alrededor de  $7798 \mu\text{m}^2$  en promedio y tres islotes por laminilla (figura 31C).

Para el segundo experimento se marcaron algunas diferencias de tratamiento; se aplicaron dosis de 50 mg/kg de STZ y un refuerzo al día 7 del experimento, se incluyó el tratamiento del extracto acuoso (grupo I), en esta ocasión se utilizó como fármaco control Sitagliptina (100 mg/kg) y los tratamientos se suministraron vía oral cada 12 hrs, la duración del protocolo se extendió 7 días más al primer experimento, 49 días en total y se les suministró el tratamiento por seis semanas, ya que con el primer experimento se deseaba saber el comportamiento de la glucemia una semana después por la acumulación de fármaco.

En el segundo experimento las cifras de glucosa mostraron un mejor comportamiento (figura 26), las ratas tratadas con moringa tuvieron glucemias inferiores al de la respuesta con Sitagliptina y éste comportamiento era más estable, las ratas con DM sin tratamiento presentaron picos muy pronunciados y drásticos, esta respuesta es debida al descontrol de la glucemia y desorden

metabólico El análisis estadístico ANOVA de dos vías (ANEXO G) mostró diferencia significativa en los tratamientos, con una  $p < 0.0001$ , en el día 0 todos los tratamientos son iguales, todos los grupos difieren del control en el día 7, al inicio del tratamiento en el día 14 no existe diferencia entre los grupos con extracto etanólico y acuoso de moringa así como en el grupo con sitagliptina, pero sí en el grupo con DM sin tratamiento, en el día 21 los grupos tratados con los extractos (acuoso y etanólico) estadísticamente se comportaron de la misma forma, el grupo de sitagliptina se comportó a la par del grupo DM sin tratamiento, al día 42 los grupos de moringa se comportaron igual, aunque si observamos la trayectoria de los datos los grupos de extractos etanólico (E) y acuoso (I) mantienen las cifras de glucosa sin tanta variación en los datos.

Mientras tanto, los análisis histopatológicos revelaron que la diabetes experimental con STZ causó graves lesiones en el páncreas (figura 33A) específicamente hablando de las células  $\beta$  pancreáticas puesto que su daño es localizado, aunque no las destruye totalmente.

Los análisis histopatológicos del segundo experimento mostraron resultados similares a los del primero. La figura 33A corresponde a ratas del Grupo control, se puede apreciar en muy buen estado el islote, conservando todas las características morfológicas normales, los acinos pancreáticos rodeando el islote con un color rosado más intenso y el islote un rosado pálido, el tejido se aprecia libre de necrosis, ni presencia de hemorragia o inflamación, Liu *et al.*, (2013) realizaron análisis histopatológicos con extractos de *Swertia bimaculata* *In vitro* e *In vivo*, y los resultados tienen semejanza entre los reportados en estos experimentos. La figura 33E corresponde a las ratas del grupo con DM sin tratamiento, se aprecian cambios anormales evidentes en la forma de una reducción clara de los islotes pancreáticos, de forma irregular, y los cambios atróficos. La figura 33B corresponde a un islote de ratas con DM tratadas con 300mg/kg Extracto Etanólico de Moringa se aprecia el islote con buen tamaño, los islotes se encuentran protegidos del daño celular, libre de necrosis ni hemorragia, la figura 33D es del grupo con DM tratadas con 100 mg/kg Sitagliptina, el tejido se encuentra necrosado y las células lisadas en comparación al la figura A del grupo control. La figura 33C corresponde al grupo de DM tratada con 300mg/kg de extracto acuoso de moringa, los islotes pancreáticos mantienen un tamaño adecuado al control, no existe necrosis celular ni inflamación.

Al realizar el análisis histopatológicos de riñón del primer experimento (figura 32) se encontraron algunas diferencias morfológicas causantes de la cronicidad de la enfermedad, en la figura 32A fácilmente se identifican las células que componen al corpúsculo renal: la cápsula de Bowman, glomérulo de Malpighi, podocitos y células mesangiales. En ésta figura todas las células se encuentran en buen estado, tienen buen espacio de filtración, no hay hemorragias internas, ni necrosis, los túbulos contorneados renales (proximales y distales), túbulos renales rectos y los vasos sanguíneos se aprecian correctamente. La figura 32B pertenece a las ratas del grupo con DM sin tratamiento, se puede apreciar zonas de hemorragia internas en los corpúsculos y saturación de hematíes. La figura 32C corresponde al grupo de DM tratadas con 300mg/kg extracto etanólico de moringa, la estructura no presenta cambios morfológicos, el espacio de filtración se conserva correctamente y no se observan hemorragias, en cambio las ratas con DM y tratadas con 350 mg/kg metformina son evidentes zonas con mayor saturación de hematíes en los túbulos y el espacio de filtración glomerular incrementado, es probable la presencia de hematuria en miembros de este grupo. En la actualidad no hay reportes de que las hojas de moringa mejoren la función renal secundaria a DM, un grupo de investigadores Soto *et al* (2012) realizaron un estudio y determinaron que el polvo de semillas de moringa restauró los tejidos renales a su histología normal sin cambios histopatológicos. (Soto *et al.*, 2012).

En la figura 34 se presentan una serie de imágenes tomadas de laminillas de cortes histológicos de riñón en tinción hematoxilina-eosina a un aumento de 20X del segundo experimento. Las laminillas de las ratas control (figura 34A), se pueden apreciar bien sus estructuras celulares sin daño aparente, bien definido su corpúsculo renal, túbulos contorneados distales y proximales intactos. La figura 34B es propia de una rata con DM sin tratamiento, se puede ver un incremento en el espacio de filtración y lisis. Las ratas tratadas con extractos etanólicos de moringa (figura 34C) presentaron una mejor morfología que las ratas con DM sin tratamiento, se pueden ver corpúsculos de tamaño normal, se ve aumentado el tráfico sanguíneo en los túbulos, la figura 34D corresponde a una rata tratada con Sitagliptina, se observa hemorragia global focal e inflamación dentro del corpúsculo renal y el espacio de filtración incrementado, así como hematíes en el mismo espacio, esto ocasiona hematuria en los animales. Los glomérulos de la imagen 34E corresponden a ratas con DM tratadas con extracto acuoso de moringa, se ve incremento ligeramente de hematíes dentro del corpúsculo, aunque no se ve lisis ni inflamación.

La DM por ser una enfermedad multisistémica afecta otros órganos si no existe un control sobre la glucemia, una de las complicaciones es incremento de los triglicéridos y colesterol llamada dislipidemia, afecta directamente a la tensión arterial y los riñones ocasionando nefropatía diabética e Insuficiencia renal a largo plazo, puede afectar además los nervios periféricos llamada neuropatía diabética, además afecta la presión intraocular ocasionando retinopatía diabética y glaucoma. El glaucoma se incrementa hasta en un 40% en pacientes con DM (Pérez 1997; Hernández, 2013; Kasper *et al.*, 2015; ADA, AMD 2015).

La dislipidemia se presenta como resultado de la disminución en la oxidación de glucosa y la reducción de su depósito como glucógeno (Abdulrahman *et al.*, 2014).se cuantificaron las concentraciones de colesterol en todas las ratas de los experimentos (figura 21 correspondiente al primer experimento y figura 27 correspondiente al segundo experimento), las cifras basales de colesterol para las ratas hembras *Wistar* oscilan entre los 20 y 82 mg/dL (Castello *et al.*, 2011). Las ratas del primer experimento

Todas las ratas en el día cero presentaron valores basales normales y al pasar el tiempo se puede ver una ligera disminución de estas cifras con el extracto de moringa para el día 42, en el análisis de varianza con  $p < 0.0001$  y un intervalo de confianza del 95% y en el análisis múltiple comparativo no hay diferencias entre el grupo control y extracto de moringa y en el grupo de ratas con DM tratadas con metformina. Se conocía ya las propiedades hipolipemiantes de extractos de moringa con las investigaciones de Ghasi *et al.*, (2000), Chumark *et al.*, (2008) y Jain *et al.*, (2010) mediante un extracto metanólico, los resultados presentados en este primer experimento corroboran lo ya expuesto, las cifras de colesterol para las ratas que recibieron el suministro de extracto etanólico de moringa fueron menores a las ratas con DM que no recibieron tratamiento.

Continuando con las mediciones de colesterol para las ratas del segundo experimento representados en la figura 27 parten de cifras basales, y se incrementan éstas cifras en las ratas a las cuales se les indujo DM, las ratas con DM que no recibieron tratamiento al día 42 del experimento presentaron cifras superiores a las 100 mg/dL comparándolas con las del grupo control que se permanecieron debajo de los 80 mg/dL. Las ratas que mantuvieron más estables sus niveles e incluso descendieron fueron las que tratadas con extracto acuoso de moringa, extracto etanólico y sitagliptina. Según el análisis estadístico comparativo existe diferencia significativa ( $p 0.0017$ ) y 95% de intervalo de confianza, no existen



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferencias significativas entre los grupos con tratamiento de extractos de moringa y sitagliptina, al día 42 del tratamiento no existen diferencias significativas entre el grupo de extracto etanólico de moringa con el extracto acuoso de moringa, tampoco existen diferencias entre extracto acuoso de moringa y sitagliptina, de igual forma no se encontraron diferencias entre grupo control y extractos de moringa acuoso y etanólico, sin embargo, si se presentaron diferencias entre los tratamientos de extractos de moringa etanólico y acuoso con las ratas del grupo con DM sin tratamiento, al igual las ratas tratadas con sitagliptina y ratas con DM sin tratamiento. Por lo que se corrobora lo dicho por Ghasi *et al.*, (2000) y Chumark *et al.*, (2008) que los extractos acuosos de moringa favorecen a reducciones de colesterol. Las hojas de Moringa oleifera tienen actividad hipocolesterolemica.

La dislipidemia implica también el incremento de triglicéridos, las ratas del primer experimento tratadas con extracto etanólico de moringa y metformina descendieron al iniciar el tratamiento y se mantuvieron estables, (figura 22) con cifras a lo largo del ensayo parecidas a las del grupo control entre los 40 y 90 mg/dL, por lo que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos de extracto de moringa, metformina y el grupo control. Los tratamientos que tienen diferencia son las ratas control y las tratadas con metformina y también las que reaccionaron distinto fueron las ratas con metformina comparadas las del extracto etanólico al final del ensayo. Las cifras normales de triglicéridos en ratas hembras *wistar* resultan ser menores a 100 mg/dL (Castello *et al.*, 2011). En el segundo experimento (figura 28) no se presentaron diferencias estadísticas en las ratas del grupo control con las de los extractos etanólico y acuoso de moringa (I), sin embargo, sí existen diferencias entre las ratas control y sitagliptina con un valor p 0.0016 en la interacción y un 95% de nivel de confianza.

Para saber si moringa influía en el estado nutricional se midieron proteínas totales en el primer experimento (figura 23), el análisis de varianza y de comparación (Tukey) señala que solo existen diferencias de proteínas en el día 21 entre los grupos de ratas enfermas tratadas con metformina y extracto de moringa, así como ratas sin DM suplementadas con moringa y ratas control contra metformina. Se puede mostrar que las ratas enfermas y las no enfermas suplementadas con Moringa mantienen mejores cifras de proteínas totales a las ratas tratadas con metformina como fue mencionado por Jaiswal (2009). Los valores normales de proteínas fluctúan de 4 - 7.8 g/dL (Castello *et al.*, 2011)



La insulina puede verse ligeramente incrementada en DM tipo 2 y reducida en DM tipo 1 (Pérez 1997), el análisis de varianza de insulina para ambos experimentos (figura 24 y figura 28 respectivamente), muestran que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de Insulina y grupos de tratamiento. Las concentraciones de Insulina oscilan entre 1.3-3.8 ng/ml (Poveda *et al.*, 2007).

Para saber si moringa influía en el estado nutricional relacionado al peso de los animales se realizaron mediciones de relación peso y tiempo por tratamiento (figura 25 y 30), respectivamente al primer y segundo experimento. Según el análisis de comparación no existe diferencia significativa entre los grupos control y suplementados con extracto de moringa, con controles con fármacos ni ratas no diabéticas con moringa.

## 10. CONCLUSIONES

Las plantas de *Moringa oleifera* se lograron propagar exitosamente por CTV (*in vitro*) sin reguladores de crecimiento con esto se logró una gran cantidad de plantas, lo mismo, sucedió con la germinación en sustrato (*ex vitro*) tanto en condiciones de laboratorio como en invernadero, teniendo un mejor índice de germinación en invernadero y un crecimiento más fructífero.

Las hojas *ex vitro* e *in vitro* no diferencian mucho en nutrientes, salvo el Potasio, con mayor cantidad las hojas *in vitro* y en Sodio. Las hojas *ex vitro* comparadas con la referencia solo diferencian en contenido de proteínas, el resto de los macronutrientes son iguales para hojas *in vitro* como *ex vitro* y las de la literatura reportada.

Las hojas de moringa tienen un alto contenido de Calcio, Hierro, Potasio y proteínas, supera a algunos alimentos en su contenido.

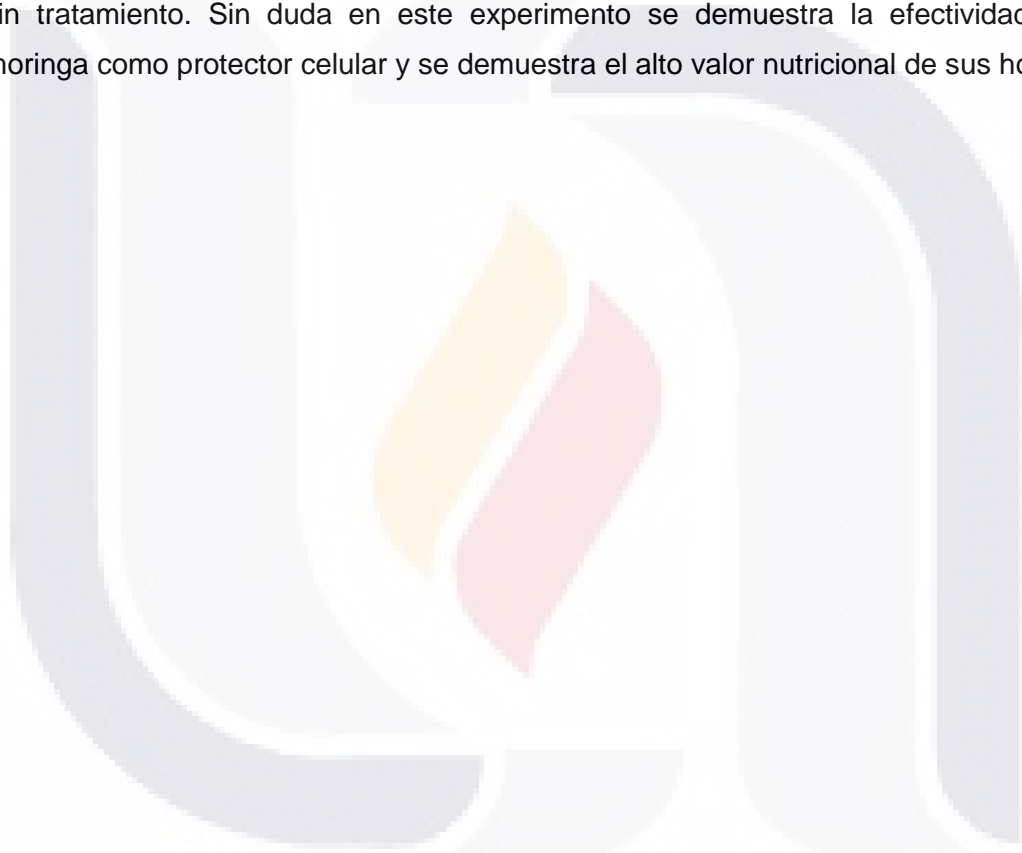
El método de diabetización no fue el adecuado, pues se desarrolló DM tipo 1, generando glucemias muy elevadas lo que no permitió el descenso de la glucosa en ninguno de los grupos, tanto grupos tratados con medicamento como los grupos tratados con moringa. Falta realizar más experimentos para poder estandarizar la técnica de diabetización y agregar un protector de células beta pancreáticas y generar de forma experimental DM tipo 2. Las cepas de ratas influyen drásticamente en la sensibilidad al fármaco, nuestra cepa de ratas *wistar* resultó altamente sensible a las dosis de STZ.

Los extractos de moringa parecen tener efecto hipoglucemiante aunque falta realizar más experimentos para poder apreciar de forma crónica estos resultados. Tanto los extractos acuosos como etanólicos son efectivos para tratar las dislipidemias, ya que redujeron satisfactoriamente las cifras de colesterol y triglicéridos.

Los extractos de moringa y hojas de moringa pulverizada no parecen tener efecto en el estado nutricional de ratas en un mes de tratamiento a 300 mg/kg, probablemente tenga que suplementarse en mayor dosis.

Los extractos de moringa no afectaron las concentraciones de Insulina aunque falta realizar más pruebas agudas y medir en diferentes tiempos la concentración de insulina.

Las hojas de moringa en extracto tanto etanólico como acuoso resultaron tener efectos positivos en el análisis histopatológico de páncreas, los extractos tienen efecto protector en los islotes de Langerhans preservando y rejuveneciendo a las células y evitando el daño celular. Así mismo, los extractos de moringa resultan ser benéficos y protectores contra daño renal, protegiendo los corpúsculos renales y mejorando la filtración glomerular comparando el daño ocasionado en DM sin tratamiento. Sin duda en este experimento se demuestra la efectividad de moringa como protector celular y se demuestra el alto valor nutricional de sus hojas.



## 11. REFERENCIAS

- Abdulrahman, L., Al-Malki, Haddad A. (2014). The Antidiabetic Effect of Low Doses of *Moringa oleifera* Lam. Seeds on Streptozotocin Induced Diabetes and Diabetic Nephropathy in Male Rats. *BioMed Research International* 15:1-13 doi:10.1155/2015/381040.
- Adedapo A. A., Mogbojuri O. M., Emikpe B. O., Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats (2009) *Journal of Medicinal Plants Research* 3(8) 586-591.
- Adelnour-Esquivel, A., & Escalant, J. V. (1994). Conceptos Básicos de Cultivos de Tejidos Vegetales. Ed. CATIE. México.1-16.
- Alfaro N. C. (2008) Rendimiento y uso potencial de Paraíso Blanco, *Moringa oleifera* Lam en la producción de alimentos de alto valor nutritivo para su utilización en comunidades de alta vulnerabilidad alimentario-nutricional de Guatemala. Trabajo de tesis. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) y Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT). Guatemala.
- Alfaro, J., Simal, A., Botella, F. (2000) Tratamiento de la diabetes mellitus. *Inf Ter Sist Nac Salud* 2000(24): 33-43.
- Amaya-Chávez, A., Dolores-Ledezma E., Álvarez-Sánchez P., Ferreira-Rubio F. Manuel Gómez-Oliván L., Galar-Martínez M. (2007) Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglucémica de la glibenclamida. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 38( 3) 5-11.
- Arenas M., Arévalo J., Rocha J., Acosta M., E. (2010). Aspectos embriológicos y morfológicos del páncreas. *Revista de la Facultad de ciencias de la salud*. 2(2): 130-134.
- Arredondo A. (2012) Costs, quality of care and financial consequences from diabetes in México: Implications to the Health System and to Patients. Health Care Collection, Nova Sci Publishers. Public Health. 119(8):711-20.

- Asomugha A. L., Ezejindu D.N., Asomugha R.N., Anyabolu A.E., Ojukwu P.C. (2015). Evaluation of Toxicity Effect of Graded Doses of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Blood Indices Using 20 Adult Wistar Rats. *International Journal of Biomedical and Advance Research*. 6(02): 98-102.
- Bailey, C. J. (2005). Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes care* 30(8) 553-564. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare>.
- Biswas, S. K., Chowdhury, A., Das, J., Roy A., Zahid Hosen S. M. (2012), Pharmacological potentials of *Moringa oleifera* Lam.: A review *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Reserch*. 3(02): 305-310.
- Brake A. G., Aderibigbe A. O., Ademowo O. G. (2013) Studies on neuropharmacological profile of etanol extract of *Moringa oleifera* leaves in mice. *Journal of Ethnopharcology* 149: 783-789. [doi.or/10.1016/j.jep.2013.08.006](http://doi.or/10.1016/j.jep.2013.08.006).
- Calva C., G., & Pérez V., J. (2005) Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* 6(11) 1067-6079.
- Castello Branco A. C., Formiga Melo Diniz , M.F., Nóbrega De Almeida R., Bandeira Santos H., Mendes De Oliveira K., Amaral Ramalho J., Gomes Dantas J. (2011). Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Rats and Swiss Mice in the Professor Thomas George Animal Laboratory. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 15(2) 209-214 2011.
- Chuang P. H., Lee C. W., Chou C. Y., Murugan M., Shieh B. J., Chen H. M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Journal. Bioresour. Technol*. 98: 232-236.
- Chumark P., Khunawat P., Sanvarinda Y., Phornchirasil S., Morales N. P., Phivthong-ngame, L., Ratanachamnong P., Srisawatf S., Klai-upsorn S., Pongrapeeporn K. U. (2008). The *in vitro and ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves *Journal of Ethnopharmacology* 116; 439–446.

- Del Toro, J., Carballo A., y Rocha L. (2011) Valoración de las propiedades nutricionales de *Moringa oleifera* en el departamento de Bolívar. Revista de Ciencias. Universidad de Cartagena. 15, p23-30. 8p.
- Di Girolamo, G., Tamez Peña, A. L., Tamez Pérez H., E. (2008). Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4: farmacodinamia, farmacocinética y seguridad. Medigraphic Artemisa en línea. Med Int Mex 2008;24 (2):142-7.
- Edoga C. O., Njoku O. O., Amadi E. N., Okeke J. J. (2013). Blood Sugar Lowering Effect of *Moringa oleifera* Lam in Albino Rats. *International Journal of Science and Technology* 3 (1) 2224-3677.
- Escorcía S. (2009) Artículo de revisión Hipoglucemia por fármacos antidiabéticos. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 17 (3); 120-128.
- Fahey Jed.W. (2005) *Moringa oleifera*: a Review of the Mediccal Evidence for its Nutritional Therapeutic, and Prophylactic properties. Part I. *Journal Trees for live* 2005, 1:5
- Falasca S. & Bernabé M. (2008) Potenciales usos y delimitación del área de cultivo de *Moringa oleifera* en Argentina Revista Virtual REDESMA. 1(3): 1.
- Farooq A., Sajid L., Muhammad A., Anwarul Hassan G. (2007) *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytotherapy Research. Phytother. Review Article*. 21: 17–25. DOI: 10.1002/ptr.2023.
- Farooq, F., Rai M., Tiwari A., Arif Khan, A. and Farooq S. (2012) Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(27): 4368-4374. doi: 10.5897/jmpr12.279.
- Fatima, T., Sohail Sajid, M., Jawad-ul-Hassan, M., Siddique, R. M., Iqbal Z., (2014) Phytomedicinal Value of *Moringa oleifera* With Special Reference To Antiparasitics Pak. J. Agri. Sci., 51(1), 251-262.
- Ferreira, L., Teixeira-de-Lemos,E., Pinto,P., Parada,B., Mega, C., Vala, H., Pinto, R., Garrido, P., Sereno, J., Fernandes, R., Santos,P., Velada, I., Melo, A., Nunes, S., Teixeira, F., Reis F. (2010) Effects of Sitagliptin Treatment on



Dysmetabolism, Inflammation, and Oxidative Stress in an Animal Model of Type 2 Diabetes (ZDF Rat) *Hindawi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation*. (11) 11 pages. Doi:10.1155/2010/592760.

Ferreira, Pinheiro P. M., Farias, D. F., Oliveira, de Abreu J. T., Carvalho, Urano., A. F., (2008) *Moringa oleifera*: Compostos bioactivos e potencialida de. *Rev. Nutr., Campinas*. 21(4):431-437.

Foidl, N ; Mayorga, L y Cásquez, W. (2003). Conferencia electrónica de la FAO sobre “Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica”.

García Luján., C., Pérez Hernández, B., Martínez Romero A., Castro Barraza F., (2009) Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*. 8:229-239.

Ghasi, S., Nwobodo, E., Ofili, J. O. (2000). Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *J. Ethnopharmacol*. 69: 21–25.

Glover-Amengor M, & Mensah F. (2012) Nutritional evaluation of *Moringa oleifera* leaves using three drying methods. *Journal of Reseach in Biology* 2(5): 569-473.

Gómez F. (2003) Desnutrición, *Rev. Salud pública México*. 45(Supl. 4): 576-582.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Santhosh Kumar, D. (2016) *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Journal Food Science and Human Wellness* 5(2) 49–56. doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001.

Guevara Medina, J. R., Rovira Quintero M. G., (2012). Caracterización de extractos de *Moringa oleifera* Lam y evaluación de sus condiciones de infusión en sus características fisicoquímicas. Honduras. Proyecto para obtener título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura.1-38.

Dhakar Ram C., Maurya Sheo D., Pooniya Brijendra K, Bairwa Narendra, Gupta Manisha, Sanwarmal (2011) Moringa, the herbal gold to combat malnutrition. *Journal Chron Young Sci*; 2(3):119-25.

Gupta R., Mathur, Bajaj K. V., Katariya P., Yadav., Kamal R., Gupta R. (2012). Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleífera* in experimental diabetes. *Journal od Diabetes* (4)164-171. Doi 10.1111/j.1753-0407.2011.00173.x.

Hamza A. A. (2010) Ameliorative affects of *Moringa oleífera* Lam seed extracto in liver fibrosis in rats. *Journal Food and Chemical Toxicology*; 48: 345-355.

Hernández Pedraza A. E. (2013) Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad antidiabética obtenidos a partir de *Lentinus lepideus*. Tesis para obtener grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P., Reynoso-Noverón, N., (2013) *Diabetes mellitus* en México. El estado de la epidemia. *Rev. Salud Pública Méx.* 55(2):129-136.

Jain, Pankaj G., Patil, Savita D., Haswani, Nitin G., Girase, Manoj V., Surana, Sanjay J.. (2010). Atividade hipolipidêmica de *Moringa oleífera* Lam., Moringaceae, in a hiperlipidemia induzida por dieta rica em gordura em ratos albinos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20 (6): 969-973. Doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000038.

Jaiswal D., Kumar Rai, P.,Metha S., Chatterji S., Shukla S., Kumar Rai D., Sharma G., Sharma B., Khair S., Watal G. (2013) Role of *Moringa oleífera* in regulation of diabetes induced oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 426-432.

Jaiswal, D., Kumar Rai, P., Kumar, A., Mehta, S., Watal G. (2009). Effect of *Moringa oleífera* Lam. Leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 123 392–396 . Doi:10.1016/j.jep.2009.03.036.

Jayaraj A. F., Bolleddula J., L. Karl O., y Muraleedharan G. N., (2004). Secretagogos de insulina de *Moringa oleifera* con ciclooxigenasa Enzymeand peroxidación lipídica inhibitoria Activities. Bioactivos Productos Naturales y Phytoceuticals, Departamento de Horticultura y Nacional de Seguridad Alimentaria and Toxicology Center 48824.

Junod, A., Lambert, A., Stauffacher, W., Renold A. E. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. The Journal of Clinical Investigation. 48; 1969-2129.

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J., Loscalzo. J. (2015) Harrison's TM Principles of Internal Medicine, Nineteenth Edition Copyright © 2015 by McGraw-Hill United States of America. pp.2275-2300.

Leone, A., Fiorillo G., Criscuoli F., Ravasenghi S., Sanragostini L., Fico G., Spadafranca A., Battezzati A., Schiraldi A., Pozzi F., Di Lello S., Filippini S., Bertoli S. (2015). Nutricional characterization and phenolic profiling of *Moringa oleifera* leaves grown in Chad, Sahrawi Refugee Campus and Haiti. *Int.J. Mol. Sci.* 16: 18923-18937. Doi:10.3390/ijms160818923.

Leiva, A., Varas, P., Ludwig, A., Contreras-Duarte, Maíz, S., & Rigotti, Atilio. A., (2010). Sitagliptina, un inhibidor de la enzima DPP-IV, aumenta el colesterol plasmático total, altera el perfil de colesterol lipoproteico y disminuye el transporte reverso de colesterol en ratones. *Revista chilena de cardiología.* 29(3): 342-350.

Liu, Z., Wan, L., Yue, Y., Xiao, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Chen, C., Min, Q., Chen, J. (2013) Research Article Hypoglycemic Activity and Antioxidative Stress of Extracts and Corymbiferin from *Swertia bimaculata* *In vitro* and *In Vivo*. *Journal Evidence-Based Complementary and Alternative.* Vol 2013:1-13 Doi.org/101155/2013/125416.

Luna Martínez J. F. (2011) Síntesis y caracterización de materiales nanoestructurados a base de una matriz polimérica de carboximetilcelulosa. Trabajo de tesis para obtener grado de maestría. Universidad Autónoma de León, Mexico. 15-17.

- Magaña Benítez, W. (2012). Aprovechamiento poscosecha de la Moringa (*Moringa oleífera*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13(2): 171-174.
- Mahan, L. K., Escott-Stump, S., Raymond, J. L. (2013). Krause Dietoterapia Editorial Elsevier 13ª ed.( Barcelona) pp. 675-686.
- Makonnen, E., Hunde, A., Damecha, G., (1997). Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. *Journal Phytotherapy Research* 11, 147–148.
- Marrero D., Delange, I., Vicente Murillo R., González Canavaciolo, V., Gutiérrez Amaro J. (2014) Composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de *Moringa oleífera* que crece en La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 19(2):197-204.
- Mateos Santa C., Zacarías Castillo R. (2002) Tratamiento farmacológico para la Diabetes mellitus. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González* 5(1); 33-41.
- Mathur, M., Yadav, S., Katariya, P., K. Kamal, R. (2014) *In vitro* propagation and biosynthesis of steroidal sapogenins from various morphogenetic stages of *Moringa oleifera* Lam., and their antioxidant potential. *Acta Physiol Plant* 36:1749–1762 DOI 10.1007/s11738-014-1549-1.
- McNeill J. H. *Experimental Models of Diabetes* Boca raton, F. L. (1999) CRC Press Faculty of Pharmaceutical Science, University of British Columbia, Vancouver, Canada. 424-430.
- Mora-Morales, E. (2016). Estado actual de la diabetes mellitus en el mundo. *Acta Médica Costarricense*. 56(2): 44-46.
- Moyo, B., Masika, P., Hugo, A., Muchenje V. (2011) Paper Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*. 10(60): 12925-12933. doi: 10.5897/AJB10.1599.
- Nahid R., Perumal S., Klaus B. (2002) Evaluation of nutritional quality of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves as an alternative protein source for Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*. 217(1-4): 599–611.  
doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00497-0.

- Nandave M., Ojha S. K., Joshi S., Kumari S., Arya D .S. (2009) *Moringa oleifera* leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence for an antioxidant, antiperoxidative, and cardioprotective intervention. *J Med Food*. 12(1):47-55. doi: 10.1089/jmf.2007.0563.
- Ndong M., Uehara M., Katsumata S., Suzuki K. (2007). Effects of Oral Administration of *Moringa oleifera* Lam on Glucose Tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar Rats. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 40: 229-223.
- Offor, I. F., Ehiri, R. C., Njoku, C. N. (2014) Proximate Nutritional Analysis and Heavy Metal Composition of Dried *Moringa oleifera* Leaves from Oshiri Onicha. *Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)* 8(1): 57-62.
- Ogbunugafor H. A., Eneh F. U., Ozumba A. N., Igwo-Ezikpe M. N., Okpuzor J., Igwilo I. O., Adenekan S. O. , Onyekwelu O. A. (2011). Physico-chemical and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed oil. *Pak. J. Nutr.* 10:409-414.
- Olson M. E., Fahey J. W. (2011) Taxonomía y sistemática *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Rev. Mex. Biodiv.* 82(4), 1071-1082.
- Olson, M. E., & Alvarado-Cárdenas, L. O. (2016). ¿Dónde cultivar el árbol milagro, *Moringa oleifera* en México?. Un análisis de su distribución potencial. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(3): 1089-1102 .doi.org/10.1016/j.rmb.2016.07.007.
- Olvera-Granados, C. P., Leo-Amador, G. E., Hernández-Montiel, HL (2008) Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina ¿Regeneración?. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 65(4):306-324.

- Oparinde, D. P., Atiba, A. S., Ajose, O. A., Eludoyin A. A., Adesiyan A. A. (2014). Effect of *Moringa oleifera* leaf extract on serum lipids and glycaemic control in alloxan induced diabetic albino rats. 5(10):519-522.  
Doi: <http://dx.doi.org/10.7439/ijbar.v5i10.887>.
- Paliwal R., Sharma V., Pracheta, Sharma S., Yadav S., Sharma S. (2011) Antinephrotoxic effect of administration of *Moringa oleifera* Lam in amelioration of DMBA induced renal carcinogenesis in Swiss albino mice. *J. Biology and Medicine*. 3(1):27-35.
- Penicaud L., Hitier Y., Ferre P., Girard J., (1989). Hypoglycaemic effect of metformin in genetically obese (fa/fa) rats results from an increased utilization of blood glucose by intestine. *J. Biochem* (262) 881-885.
- Pérez, A., Sánchez, T., Armengol N., y Reyes F. (2010) Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. *Rev. Pastos y Forrajes* 33 (4):1-16
- Poveda E., Trujillo P., Ruiz F., López E. (2007) Glucemia y concentraciones de insulina en sangre de ratas *Wistar* sometidas a dieta alta en grasa y a tratamiento con péptidos miméticos de leptina. *Rev. Biomédica* 28:50-63.
- Ramos Rodríguez, H., Domingo Méndez, J. (1994) Diabetes experimental. *Rev. Ciencia veterinaria*. 6(1):347-377.
- Reyes S., N.; Ledin, S., Ledin I., (2006) Biomass production and chemical composition of *Moringa oleifera* under different management regimes in Nicaragua, Nicaragua-Sweden. *Journal Agroforestry Systems* 66: 231–242.
- Rivas-Vega, M., Cruz-Suarez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (2010). Avances en la evaluación de ingredientes para tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) cultivada en agua de mar. *Rev Avances en Nutrición Acuícola X Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*, N. L., México. 467 – 484.



- Rivera Dommarco, J. A. (2012). Deficiencias de micronutrientes en México: un problema invisible de salud pública. *Rev Salud Pública de México*, 54(2):101-102.
- Rizky H., Ingga Yonico M., Putranto W. (2013). Future of Health Plant: High Light of *Moringa oleifera* Using in Indonesia. 24(1):234-249.
- Robles, N. R., Alcázar, R., González Albarrán, O., Honorato, J., Acha, J., de Álvaro, F., Fernández Gallego, V., Gómez García, P., López de la Torre, M., Martínez Castela M., Romero R., (2006) Manejo práctico de antidiabéticos orales en pacientes con enfermedad renal. *Rev. de Nefrología* 26(5): 538-558.
- Roca, M. Mroginski W. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Edit. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali Colombia.
- Rosado, M. J., Bourges, H., Saint-Martin, B. (1995) Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: ii. deficiencia de vitaminas. *Rev Salud Pública Méx.* 37(5):452-461
- Rosales H., A. L. (1994) Determinación de hemoglobina glicada (HbA1c) en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. Tesina profesional para obtener el título de licenciatura en biología experimental. Unidad de investigación Experimental Instituto Nacional De La Nutricion Salvador Zubirán. México, D.F.
- Saini, R. K., Shetty, N. P., Giridhar, P., Ravishanka, G. A. (2012) Rapid *in vitro* regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. *J Biotech* 2:187–192. doi10.1007/s13205-012-0045-9.
- Soto-Domínguez, A., García-Garza, R., Ramírez-Casas, Y., Morán-Martínez, J., & Serrano-Gallardo, L. B. (2012). El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto tóxico *in vitro e in vivo*. *International Journal of Morphology*, 30(3), 937-944. doi.org/10.4067/S0717-95022012000300029.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Surya, S., Salam, A., D., Vallikattukuzhiyil Tomy, D., Ravindrakurup Arun Kumar, B. C., Sunil C., (2014) *Diabetes mellitus* and medicinal plants a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4(5): 337-347.

Umesha, S., Marahel, S., Aberomand, M. (2013) Antioxidant and antidiabetic activities of medicinal plants: A short review. *Int. Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology*. 3(1): 40-53.

Valdés, S., Rojo-Martínez G., Soriguer F. (2007) Evolución de la prevalencia de la diabetes tipo 2 en población adulta española. *Rev Med Clin (Barc)* 129 (9):352-355.

Villalpando, S., Montalvo-Velarde, I., Zambrano, N., García-Guerra, A., Ramírez-Silva, C., Shamah-Levy, T., Rivera, J. A. (2003). Vitamins A, and C and folate status in Mexican children under 12 years and women 12-49 years: a probabilistic national survey. *Revista Salud Pública de México*. 45(4):508-519.

Villarreal-Gómez, A., Ortega Angulo, K. J. (2014). Revisión de las características y usos de la planta *Moringa oleífera*. *Rev Investigación y Desarrollo*. 22(2):309-330.

Vinicio-Gutiérrez M., Salas R. E. , Bertsch, F. (2002) Fertilización Foliar: Principios y Aplicaciones. Asociación costarricense de la ciencia del suelo.

Williams, L. (2013) *Moringa oleífera*: could this be an answer to our need for an alternative to fighting drug-resistance and chronic infections? *J Med Aromat Plants* 2:142. Doi:10.4172/2167-0412.1000e14.

**Sitios Web:**

WHO. Sistema de Información Nutricional sobre Vitaminas y Minerales (VMNIS)  
Base de datos sobre micronutrientes Base de datos sobre la carencia de vitamina A <http://www.who.int/vmnis/database/vitamina/status/es/>

WFP. Programa Mundial de Alimentos

FAO, FIDA y PMA. (2012). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo.  
Roma. ISBN 978-92-5-307316-0

FIDA. Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola

ENSANUT 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Disponible  
<http://ensanut.insp.mx/doctos/seminario/M0302.pdf>

FAO (2012). Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina  
y el Caribe 2012. Resumen Ejecutivo FAO. Obtenido el de 13 de marzo de  
2015  
desde: [http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/Reporte%20Completo\\_20.pdf](http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/Reporte%20Completo_20.pdf)

FAO. (2012). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Resumen.  
Obtenido el 29 de marzo de 2015  
desde: <http://www.fao.org/docrep/016/i2845s/i2845s00.pdf>.

<http://www.diabetes.org/>, <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes>  
American Diabetes Association (ADA). Consulta: junio de 2016 . URL:

Asociación Mexicana de Diabetes (AMD). Última Actualización y Consulta: junio de  
2016. URL: <http://www.amdiabetes.org>

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, ENSANUT: <http://ensanut.insp.mx/>

Federación Mexicana de Diabetes. 2010.

Disponible: [http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes\\_numeros.php](http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php)  
<http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/estadisticas-de-diabetes-mexico.php>

Fondo Internacional de desarrollo Agrícola FIDA. Consulta junio 2015.  
<http://www.cinu.org.mx/onu/estructura/organismos/fida.htm>

Programa Mundial de Alimentos; WPF <http://es.wfp.org>. Consulta marzo 2015.

Organización Mundial de la Salud OMS. Consulta enero 2015.

[http://www.who.int/vmnis/vitamina/prevalence/vita\\_fig1b.pdf?ua=1](http://www.who.int/vmnis/vitamina/prevalence/vita_fig1b.pdf?ua=1)

Food and Agriculture Organization FAO; <http://www.fao.org/home/en/>

<http://www.who.int/vmnis/database/vitamina/status/es/>

<http://www.who.int/vmnis/database/vitamina/status/es/>

USDA United States Department of Agriculture National Agriculture Library.

Nutrient Data Laboratory. <http://fnic.nal.usda.gov/food-composition>



## 12. ANEXOS

### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

#### ANEXO A

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Glucosa

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	401978	3	133993	F (2.121, 12.72) = 12.10	P = 0.0010
Individual (between rows)	382409	6	63735	F (6, 18) = 5.758	P = 0.0017
Residual (random)	199256	18	11070		
Total	983643	27			

Was the matching effective?

F	5.758
P value	0.0017
P value summary	**
Is there significant matching (P < 0.05)?	Yes
R square	0.3888

Table Analyzed

1.GLUCOSA

Two-way RM ANOVA  
Alpha

Matching:  
Stacked  
0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	20.87	< 0.0001	****	Yes
Time	35.18	< 0.0001	****	Yes
Column Factor	35.60	< 0.0001	****	Yes
Subjects (matching)	2.851	0.0003	***	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	1.141e+006	18	63393	F (18, 96) = 20.23	P < 0.0001
Time	1.923e+006	6	320540	F (6, 96) = 102.3	P < 0.0001
Column Factor	1.946e+006	3	648809	F (3, 16) = 66.60	P < 0.0001
Subjects (matching)	155877	16	9742	F (16, 96) = 3.109	P = 0.0003
Residual	300846	96	3134		
Number of missing values	0				

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families	7
Number of comparisons per family	6
Alpha	0.05
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff. 95% CI of diff. Significant? Summary
0	
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	16.40 -88.93 to 121.7 No ns

CONTROL (B) vs. DM + MOEE	17.80 -87.53 to 123.1	No	ns
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	14.80 -90.53 to 120.1	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	1.400 -103.9 to 106.7	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	-1.600 -106.9 to 103.7	No	ns
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	-3.000 -108.3 to 102.3	No	ns
7			
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-301.2 -406.5 to -195.9	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-311.6 -416.9 to -206.3	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	-258.4 -363.7 to -153.1	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-10.40 -115.7 to 94.93	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	42.80 -62.53 to 148.1	No	ns
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	53.20 -52.13 to 158.5	No	ns
14			
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-453.2 -558.5 to -347.9	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-382.6 -487.9 to -277.3	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	-330.6 -435.9 to -225.3	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	70.60 -34.73 to 175.9	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	122.6 17.27 to 227.9	Yes	*
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	52.00 -53.33 to 157.3	No	ns
21			
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-325.6 -430.9 to -220.3	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-384.8 -490.1 to -279.5	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	-406.0 -511.3 to -300.7	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-59.20 -164.5 to 46.13	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	-80.40 -185.7 to 24.93	No	ns
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	-21.20 -126.5 to 84.13	No	ns
28			
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-405.4 -510.7 to -300.1	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-20.00 -125.3 to 85.33	No	ns
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	-164.0 -269.3 to -58.67	Yes	***
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	385.4 280.1 to 490.7	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	241.4 136.1 to 346.7	Yes	****
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	-144.0 -249.3 to -38.67	Yes	**
35			
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-464.8 -570.1 to -359.5	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-425.8 -531.1 to -320.5	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	-347.6 -452.9 to -242.3	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	39.00 -66.33 to 144.3	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	117.2 11.87 to 222.5	Yes	*
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	78.20 -27.13 to 183.5	No	ns
42			
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-96.60 -201.9 to 8.732	No	ns
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-347.6 -452.9 to -242.3	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+METF (F)	-311.8 -417.1 to -206.5	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-251.0 -356.3 to -145.7	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM+METF (F)	-215.2 -320.5 to -109.9	Yes	****
DM + MOEE vs. DM+METF (F)	35.80 -69.53 to 141.1	No	ns

## ANEXO B

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Colesterol.

Two-way RM

ANOVA

Matching: Stacked

Alpha

0.05



Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	38.37	0.0001	****	Yes
Time	36.99	0.0001	****	Yes
Column Factor	4.037	0.2120	ns	No
Subjects (matching)	12.85	0.0019	**	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	9133	6	1522	F (6, 32) = 26.38	P < 0.0001
Time	8804	2	4402	F (2, 32) = 76.29	P < 0.0001
Column Factor	961.0	3	320.3	F (3, 16) = 1.676	P = 0.2120
Subjects (matching)	3058	16	191.1	F (16, 32) = 3.312	P = 0.0019
Residual	1846	32	57.70		

### ANEXO C

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Triglicéridos.

Two-way RM ANOVA

Matching: Stacked

Alpha

0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	30.79	< 0.0001	****	Yes
Time	14.80	< 0.0001	****	Yes
Column Factor	7.644	0.0154	*	Yes
Subjects (matching)	8.667	0.1760	ns	No

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	346735	18	19263	F (18, 96) = 4.311	P < 0.0001
Time	166599	6	27766	F (6, 96) = 6.214	P < 0.0001
Column Factor	86072	3	28691	F (3, 16) = 4.704	P = 0.0154
Subjects (matching)	97583	16	6099	F (16, 96) = 1.365	P = 0.1760
Residual	428959	96	4468		

### ANEXO D

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Proteínas totales

Two-way RM ANOVA

Matching: Stacked

Alpha

0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	20.98	0.0027	**	Yes	
Time	13.31	0.0005	***	Yes	
Column Factor	22.21	0.0008	***	Yes	
Subjects (matching)	15.02	0.4287	ns	No	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	4.423	8	0.5529	F (8, 40) = 3.683	P = 0.0027
Time	2.805	2	1.403	F (2, 40) = 9.342	P = 0.0005
Column Factor	4.682	4	1.170	F (4, 20) = 7.392	P = 0.0008
Subjects (matching)	3.167	20	0.1583	F (20, 40) = 1.055	P = 0.4287
Residual	6.005	40	0.1501		

### ANEXO E

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Pesos

Table Analyzed	1.PESOS				
Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	14.80	< 0.0001	****	Yes	
Time	1.145	0.1571	ns	No	
Column Factor	18.19	0.1868	ns	No	
Subjects (matching)	53.13	< 0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	6862	12	571.8	F (12, 60) = 5.816	P < 0.0001
Time	530.5	3	176.8	F (3, 60) = 1.799	P = 0.1571
Column Factor	8432	4	2108	F (4, 20) = 1.712	P = 0.1868
Subjects (matching)	24625	20	1231	F (20, 60) = 12.52	P < 0.0001
Residual	5899	60	98.32		

### ANEXO F

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Insulina

Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked				
Alpha	0.05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	2.420	0.7112	ns	No	
Time	0.4946	0.6852	ns	No	
Column Factor	5.473	0.6505	ns	No	
Subjects (matching)	65.69	< 0.0001	****	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	1.927	6	0.3211	F (6, 40) = 0.6223	P = 0.7112
Time	0.3938	2	0.1969	F (2, 40) = 0.3816	P = 0.6852
Column Factor	4.358	3	1.453	F (3, 20) = 0.5554	P = 0.6505
Subjects (matching)	52.30	20	2.615	F (20, 40) = 5.069	P < 0.0001
Residual	20.64	40	0.5159		

Number of missing values 0

**ANEXO G**

Análisis de ANOVA para el segundo experimento. Glucosa.

Was the matching effective?

F 9.842  
 P value < 0.0001  
 P value summary \*\*\*\*  
 Is there significant matching (P < 0.05)? Yes

R square 0.3427

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	904004	4	226001	F (2.118, 14.83) = 26.04	P < 0.000
Individual (between rows)	598008	7	85430	F (7, 28) = 9.842	P < 0.000
Residual (random)	243053	28	8680		
Total	1.745e+006	39			

Table Analyzed 2.GLUCOSA

Two-way RM ANOVA Matching: Stacked  
 Alpha 0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	12.17	< 0.0001	****	Yes	
Time	32.13	< 0.0001	****	Yes	
Column Factor	47.78	< 0.0001	****	Yes	
Subjects (matching)	1.765	0.0102	*	Yes	
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	1.162e+006	28	41490	F (28, 140) = 9.884	P < 0.0001
Time	3.068e+006	7	438224	F (7, 140) = 104.4	P < 0.0001
Column Factor	4.562e+006	4	1.141e+006	F (4, 20) = 135.4	P < 0.0001
Subjects (matching)	168498	20	8425	F (20, 140) = 2.007	P = 0.0102
Residual	587682	140	4198		
Number of missing values		0			

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families	8
Number of comparisons per family	10
Alpha	0.05
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff. 95% CI of diff. Significant? Summary
0	
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-37.40 -157.4 to 82.57 No ns
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-39.60 -159.6 to 80.37 No ns
CONTROL (B) vs. DM+MOEA (I)	-69.20 -189.2 to 50.77 No ns
CONTROL (B) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-36.80 -156.8 to 83.17 No ns
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-2.200 -122.2 to 117.8 No ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+MOEA (I)	-31.80 -151.8 to 88.17 No ns

DM Sin Tx (C) vs. DM+ SITAGLIPTINA	0.6000	-119.4 to 120.6	No	ns
DM + MOEE vs. DM+MOEA (I)	-29.60	-149.6 to 90.37	No	ns
DM + MOEE vs. DM+ SITAGLIPTINA	2.800	-117.2 to 122.8	No	ns
DM+MOEA (I) vs. DM+ SITAGLIPTINA	32.40	-87.57 to 152.4	No	ns
7				
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-258.0	-378.0 to -138.0	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-337.4	-457.4 to -217.4	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+MOEA (I)	-323.4	-443.4 to -203.4	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-436.4	-556.4 to -316.4	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-79.40	-199.4 to 40.57	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+MOEA (I)	-65.40	-185.4 to 54.57	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-178.4	-298.4 to -58.43	Yes	***
DM + MOEE vs. DM+MOEA (I)	14.00	-106.0 to 134.0	No	ns
DM + MOEE vs. DM+ SITAGLIPTINA	-99.00	-219.0 to 20.97	No	ns
DM+MOEA (I) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-113.0	-233.0 to 6.965	No	ns
14				
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-160.6	-280.6 to -40.63	Yes	**
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-383.0	-503.0 to -263.0	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+MOEA (I)	-315.4	-435.4 to -195.4	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-356.4	-476.4 to -236.4	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-222.4	-342.4 to -102.4	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM+MOEA (I)	-154.8	-274.8 to -34.83	Yes	**
DM Sin Tx (C) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-195.8	-315.8 to -75.83	Yes	***
DM + MOEE vs. DM+MOEA (I)	67.60	-52.37 to 187.6	No	ns
DM + MOEE vs. DM+ SITAGLIPTINA	26.60	-93.37 to 146.6	No	ns
DM+MOEA (I) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-41.00	-161.0 to 78.97	No	ns
21				
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-552.6	-672.6 to -432.6	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-432.2	-552.2 to -312.2	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+MOEA (I)	-389.2	-509.2 to -269.2	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-591.8	-711.8 to -471.8	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	120.4	0.4347 to 240.4	Yes	*
DM Sin Tx (C) vs. DM+MOEA (I)	163.4	43.43 to 283.4	Yes	**
DM Sin Tx (C) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-39.20	-159.2 to 80.77	No	ns
DM + MOEE vs. DM+MOEA (I)	43.00	-76.97 to 163.0	No	ns
DM + MOEE vs. DM+ SITAGLIPTINA	-159.6	-279.6 to -39.63	Yes	**
DM+MOEA (I) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-202.6	-322.6 to -82.63	Yes	****
28				
CONTROL (B) vs. DM Sin Tx (C)	-348.6	-468.6 to -228.6	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM + MOEE	-387.6	-507.6 to -267.6	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+MOEA (I)	-312.8	-432.8 to -192.8	Yes	****
CONTROL (B) vs. DM+ SITAGLIPTINA	-450.4	-570.4 to -330.4	Yes	****
DM Sin Tx (C) vs. DM + MOEE	-39.00	-159.0 to 80.97	No	ns
DM Sin Tx (C) vs. DM+MOEA (I)	35.80	-84.17 to 155.8	No	ns

## ANEXO H

Análisis de ANOVA para el segundo experimento. Colesterol.

Two-way RM	Matching:			
ANOVA	Stacked			
Alpha	0.05			
	% of total	P value	P value	Significant?
Source of Variation	variation		summary	
Interaction	22.47	0.0017	**	Yes
Time	17.15	< 0.0001	****	Yes
Column Factor	12.63	0.0307	*	Yes
Subjects				
(matching)	19.04	0.2185	ns	No

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	12014	8	1502	F (8, 40) = 3.913	P = 0.0017
Time	9172	2	4586	F (2, 40) = 11.95	P < 0.0001
Column Factor	6757	4	1689	F (4, 20) = 3.317	P = 0.0307
Subjects (matching)	10183	20	509.2	F (20, 40) = 1.327	P = 0.2185
Residual	15350	40	383.8		

### ANEXO I

Análisis de ANOVA para el segundo experimento. Triglicéridos.

Two-way ANOVA	Ordinary	Alpha	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
		0.05					
			Interaction	11.79	0.0012	**	Yes
			Row Factor	48.54	< 0.0001	****	Yes
			Column Factor	16.34	< 0.0001	****	Yes
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value		
Interaction	71921	8	8990	F (8, 60) = 3.791	P = 0.0012		
Row Factor	296074	2	148037	F (2, 60) = 62.42	P < 0.0001		
Column Factor	99663	4	24916	F (4, 60) = 10.51	P < 0.0001		
Residual	142290	60	2372				

### ANEXO J

Análisis de ANOVA para el segundo experimento. Insulina

Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked	Alpha	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
		0.05					
			Interaction	19.96	< 0.0001	****	Yes
			Time	27.84	< 0.0001	****	Yes
			Column Factor	2.966	0.7481	ns	No
			Subjects (matching)	38.40	< 0.0001	****	Yes
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value		
Interaction	5.600	8	0.7000	F (8, 50) = 11.51	P < 0.0001		
Time	7.810	2	3.905	F (2, 50) = 64.22	P < 0.0001		
Column Factor	0.8322	4	0.2080	F (4, 25) = 0.4828	P = 0.7481		
Subjects (matching)	10.77	25	0.4309	F (25, 50) = 7.086	P < 0.0001		
Residual	3.040	50	0.06081				

### ANEXO K

Análisis de ANOVA para el primer experimento. Pesos

Two-way RM ANOVA	Matching: Stacked	Alpha
		0.05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	8.231	0.0008	***	Yes
Time	11.08	< 0.0001	****	Yes
Column Factor	22.40	0.0692	ns	No
Subjects (matching)	45.23	< 0.0001	****	Yes
ANOVA table				
	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)
Interaction	4953	15	330.2	F (15, 72) = 3.026
Time	6669	3	2223	F (3, 72) = 20.37
Column Factor	13479	5	2696	F (5, 24) = 2.377
Subjects (matching)	27223	24	1134	F (24, 72) = 10.39
Residual	7858	72	109.1	

