



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.  
POSGRADO EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

“USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA COMO VECTORES DE  
ADMINISTRACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *TILLANDSIA  
RECURVATA* Y SU IMPACTO SOBRE LA DIABETES MELLITUS”

Tesis que presenta

**VERÓNICA ARELLANO CERDA**

Para obtener el grado de

**Maestra en Nanociencias y Materiales**

Directora de tesis

**DRA. ALETHIA MUÑOZ RAMÍREZ**

San Luis Potosí, S. L. P., agosto de 2022



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Uso de nanopartículas de plata como vectores de administración de metabolitos secundarios de *Tillandsia recurvata* y su impacto sobre la diabetes mellitus**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Nanociencias y Materiales fue elaborada por **Verónica Arellano Cerda** y aprobada el **22 de agosto de 2022** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dra. Alethia Muñiz Ramírez**

Director/Codirectores de la tesis

---

**Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva**

Miembro del comité tutorial

---

**Dr. Armando Encinas Oropeza**

Miembro del Comité Tutorial

---

**Dr. José Luis Rodríguez López**

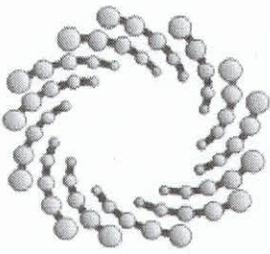
Miembro del comité tutorial



## Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Alethia Muñiz Ramírez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**107 98 81**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

La Secretaría Académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 081 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Nanociencias y Materiales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 29 días del mes de agosto del año 2022, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Armando Encinas Oropesa</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. José Luis Rodríguez López</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Alethia Muñiz Ramírez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Daniela Joyce Trujillo Silva</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN NANOCIENCIAS Y MATERIALES**

sustentó la C.

**Verónica Arellano Cerda**

sobre la Tesis intitulada:

*Uso de nanopartículas de plata como vectores de administración de metabolitos secundarios de Tillandsia recurvata y su impacto sobre la diabetes mellitus*

que se desarrolló bajo la dirección de

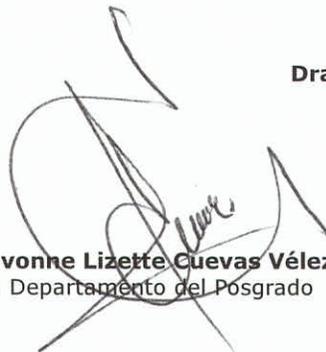
**Dra. Alethia Muñiz Ramirez**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 10:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe la Secretaría Académica del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 29 días del mes de agosto de 2022.



**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Secretaría Académica



**IPICYT**  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
INSTITUTO POTOSINO DE  
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y TECNOLÓGICA, A.C.

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Agradezco especialmente a la Dra. Alethia Muñoz Ramírez, directora de esta tesis, por la asesoría y ayuda brindada durante el período en el que estuve bajo su supervisión.

Agradezco a la Dra. Daniela Trujillo, al Dr. Armando Encinas y al Dr. José Luis Rodríguez por el apoyo y la atención brindada como miembros del comité de evaluación de este trabajo de tesis.

Agradezco de igual manera al Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN) y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por los recursos prestados para llevar a cabo la síntesis y caracterización de los materiales necesarios para realizar este proyecto.

A la M.C. Beatriz Adriana Rivera Escoto, M.C Ana Iris Peña Maldonado, al Dr. Ignacio G. Becerril Juárez por su apoyo en las caracterizaciones por microscopía electrónica y al Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios por su apoyo en la caracterización por espectroscopía infrarroja.

Agradezco a los profesores del programa de Maestría en Nanociencias y materiales por su paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo durante el período de clases. Sus enseñanzas me acompañarán siempre y me ayudarán a desarrollarme a lo largo de mi vida académica.

Agradezco a mi familia, amigos y compañeros de maestría por su amistad y su apoyo durante esta etapa tan importante que estoy concluyendo. Esperando contar con su amistad y compañía muchos años más.



GOBIERNO DE  
**MÉXICO**



## CARTA AGRADECIMIENTOS LINAN

San Luis Potosí, S.L.P. a 15 de julio del 2022.

**M.E. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
**Jefa del Departamento de Posgrado**  
**Presente**

Por medio del presente informo que la alumna **Verónica Arellano Cerda**, estudiante del Programa de **Maestría en Nanociencias y Materiales** con número de matrícula **201321**, ha proporcionado las evidencias donde menciona los créditos y agradecimientos correspondientes por uso de la Infraestructura del Laboratorio Nacional de Nanociencias y Nanotecnología, LINAN, en los siguientes productos generados durante su formación académica:

- Tesis de Grado titulada: (Nombre de la Tesis, año)  
Uso de nanopartículas como vectores de administración de metabolitos secundarios y su impacto sobre la diabetes mellitus, 2022

Sin otro particular me despido de usted

Attentamente

Vo. Bo.

Dra. Alethia Muñoz Ramirez  
Director de tesis

Dra. Gladis Judith Labrada Delgado  
Coordinadora de LINAN

## Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales.....	iii
Acta de examen .....	iv
Agradecimientos .....	v
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
1. Introducción.....	1
2. Estadísticas de diabetes .....	2
2.1. América del Norte y El Caribe .....	3
2.2. México .....	4
2.3. Mortalidad.....	6
2.4. Diagnóstico.....	6
2.5. Factores de riesgo .....	7
3. Tipos de diabetes.....	10
3.1. Diabetes mellitus tipo II.....	10
4. Complicaciones.....	13
4.1. Enfermedades cardiovasculares .....	13
4.2. Retinopatía diabética.....	14
4.3. Glicación no enzimática de proteínas y formación de productos avanzados de glicación (AGEs).....	14
4.3.1. Receptores de productos avanzados de glicación y su efecto en la diabetes .....	20
6. <i>Tillandsia recurvata</i> .....	25
6.1. Propiedades medicinales .....	25
7. Técnicas de extracción de metabolitos secundarios.....	31
7.1. Extracción con solventes .....	31
7.2. Extracción por maceración .....	32
8. Nanotecnología y nanomedicina.....	34
8.1. Nanopartículas metálicas .....	35
8.1.1. Métodos de síntesis de nanopartículas metálicas .....	35
8.1.2. Nanopartículas metálicas como sistema de liberación de fármacos. ...	38
8.1.3. Biocompatibilidad y toxicidad .....	40
9. Ensayos <i>in vivo</i> en modelo de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	44
10. Justificación .....	46

11. Objetivos .....	47
11.1. -General .....	47
11.2. -Particulares.....	47
12. Metodología .....	48
12.1. Diagrama de flujo .....	48
12.2. Acondicionamiento de materia prima .....	48
12.3. Obtención del extracto metanólico de <i>Tillandsia recurvata</i> .....	48
12.4. Caracterización del extracto metanólico de <i>Tillandsia recurvata</i> por espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada.....	48
12.5. Síntesis de nanopartículas de plata.....	49
12.6. Funcionalización de nanopartículas de plata con extracto de <i>Tillandsia recurvata</i> .....	49
12.7. Curva de calibración.....	50
12.8. Cinética de liberación del extracto .....	50
12.9. Caracterización por microscopía electrónica de barrido.....	50
12.10. Pruebas <i>in vivo</i> usando el modelo de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	51
12.10.1. Acondicionamiento del modelo <i>in vivo</i> .....	51
12.10.2. Evaluación de toxicidad.....	51
12.10.3. Inducción de hiperglucemia .....	53
12.10.4. Determinación del estado diabético.....	53
12.10.5. Evaluación hipoglucemiante .....	54
12.10.6. Evaluación de la formación de productos finales de glicación avanzada.....	55
12.11. Porcentaje de inhibición .....	55
12.11.1. Análisis estadístico .....	55
13. Resultados .....	56
13.1. Acondicionamiento de la materia prima y obtención del extracto metanólico de <i>Tillandsia recurvata</i> .....	56
13.2. Caracterización del extracto metanólico de <i>Tillandsia recurvata</i> por espectroscopía UV-vis .....	56
13.3. Caracterización del extracto metanólico de <i>Tillandsia recurvata</i> por espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) .....	57
13.4. Síntesis de nanopartículas de plata.....	59
13.5. Funcionalización de las nanopartículas de plata.....	60
13.6. Curva de calibración.....	61
13.7. Cinética de liberación.....	63

13.8.	Caracterización por microscopía electrónica de barrido.....	64
13.9.	Pruebas <i>in vivo</i> en modelo de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	66
13.9.1.	Prueba de toxicidad .....	66
13.9.1.1.	Nanopartículas de plata .....	66
13.9.2.	Inducción de hiperglucemia.....	71
13.9.3.	Evaluación hipoglucemiante.....	72
13.9.4.	Formación de productos finales de glicación avanzada.....	78
14.	Conclusiones.....	84
15.	Referencias .....	85

## RESUMEN

En el presente trabajo, titulado “Uso de nanopartículas de plata como vectores de administración de metabolitos secundarios de *Tillandsia recurvata* y su impacto sobre la diabetes mellitus”, se obtuvo el extracto de *Tillandsia recurvata* por el método de macerado en metanol y se utilizó para funcionalizar nanopartículas de plata (AgNPs) que fueran sintetizadas por el método de reducción química. Estas nanopartículas funcionalizadas fueron probadas como tratamiento hipoglucemiante en un modelo *in vivo* de *Danio rerio*; inducido con hiperglucemia y se encontró que los niveles de glucosa en sangre de los peces diabéticos sometidos a concentraciones de 80 y 100 µg/mL de nanopartículas funcionalizadas fueron menores que los de los peces tratados con glibenclamida, uno de los medicamentos orales más utilizados para tratar la diabetes mellitus tipo II. También se estudió y comparó la presencia de productos avanzados de glicación (AGEs por sus siglas en inglés) en tejido ocular de *Danio rerio* diabético para evaluar el potencial de antiglicación de las nanopartículas funcionalizadas y se observó que existe una mayor inhibición de la formación de AGEs en peces que fueron sometidos a tratamiento con nanopartículas funcionalizadas, que en el tejido ocular de peces que fueron tratados con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* por sí solo, sugiriendo que el utilizar AgNPs como vehículo acarreador de fármacos potencia la actividad antidiabética del extracto, tanto para disminuir los niveles de glucosa en sangre, como para inhibir la formación de productos avanzados de glicación.

**Palabras clave:** *nanopartículas de plata, Danio rerio, diabetes, Tillandsia recurvata, AGEs, acarreadores de fármacos.*

## ABSTRACT

In this thesis entitled "Use of metal nanoparticles as a drug delivery system for secondary metabolites of *Tillandsia recurvata* and their impact on diabetes mellitus", *Tillandsia recurvata* extract was obtained by maceration on methanol and used to functionalize silver nanoparticles that were synthesized by chemical reduction. These functionalized nanoparticles were tested as a hypoglycemic treatment in an *in vivo* model of glucose-induced hyperglycemic *Danio rerio*. It was found that the blood glucose levels of the fish group treated with 100 µg/mL of functionalized nanoparticles were lower than those treated with glibenclamide, one of the most popular oral drugs for treating type II diabetes mellitus. In addition, we also studied and compared the presence of advanced glycation products (AGEs) in glucose-induced hyperglycemic *Danio rerio* ocular tissue. Furthermore, we evaluated the antiglycation potential of the functionalized nanoparticles. We found a higher percentage of AGEs inhibition in the tissue of fish treated with functionalized nanoparticles, than in the ocular tissue of fish treated with the methanolic extract of *Tillandsia recurvata*. Finally, our results suggest that using silver nanoparticles as a drug delivery system enhances the anti-diabetic activity of the extract, both by lowering blood glucose levels and preventing the formation of AGEs.

**Key words:** *silver nanoparticles, Danio rerio, diabetes, Tillandsia recurvata, AGEs, drug delivery system.*

## **1. Introducción**

La diabetes mellitus (o simplemente diabetes) es una enfermedad crónica no transmisible que comprende un grupo de alteraciones metabólicas del sistema endócrino caracterizadas por la presencia de altos niveles de glucosa en sangre (Cole & Florez, 2020) o hiperglicemia crónica, causada por deficiencias en el funcionamiento y producción de insulina, provocando daño tisular en órganos como el riñón, ojos, sistema nervioso, corazón y vasos sanguíneos (Gupta & Kalra, 2015). Esta enfermedad está frecuentemente acompañada de alteraciones en el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos; se ha asociado fuertemente con la carga genética, la hipertensión arterial, la obesidad, una dieta rica en azúcares simples y la vida sedentaria (American Diabetes Association, 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la diabetes como un problema de salud pública (Aparicio & Marlene Durán, 2016).

La insulina es una hormona producida por las células beta del páncreas, que permite que la glucosa del torrente sanguíneo ingrese en las células del cuerpo y se transforme en energía, además es indispensable para el metabolismo de grasas y proteínas (International Diabetes Federation, 2019). Existen varios factores, tanto ambientales como genéticos, que pueden resultar en la pérdida progresiva de la función de las células beta del páncreas, esto se manifiesta clínicamente como hiperglucemia y es lo que permite diagnosticar la enfermedad utilizando el criterio de glucosa plasmática (American Diabetes Association, 2020).

## 2. Estadísticas de diabetes.

En la actualidad existen alrededor de 463 millones de adultos con diabetes diagnosticada en el mundo, esto representa el 9.3% de la población entre 20 y 79 años. Si la tendencia continúa, se proyecta que para el 2030 esta cifra aumente a 578 millones y a 700 millones para el 2045. En cuanto a niños y adolescentes, se calcula que existen alrededor de 1.1 millones de personas menores de 20 años que padecen diabetes tipo I. Se calcula que el 79.4% de las personas con diabetes en todo el mundo viven en países de ingresos bajos y medios (International Diabetes Federation, 2019). En la Figura 1 se muestra un mapa con el censo de adultos que padecían diabetes en 2019.

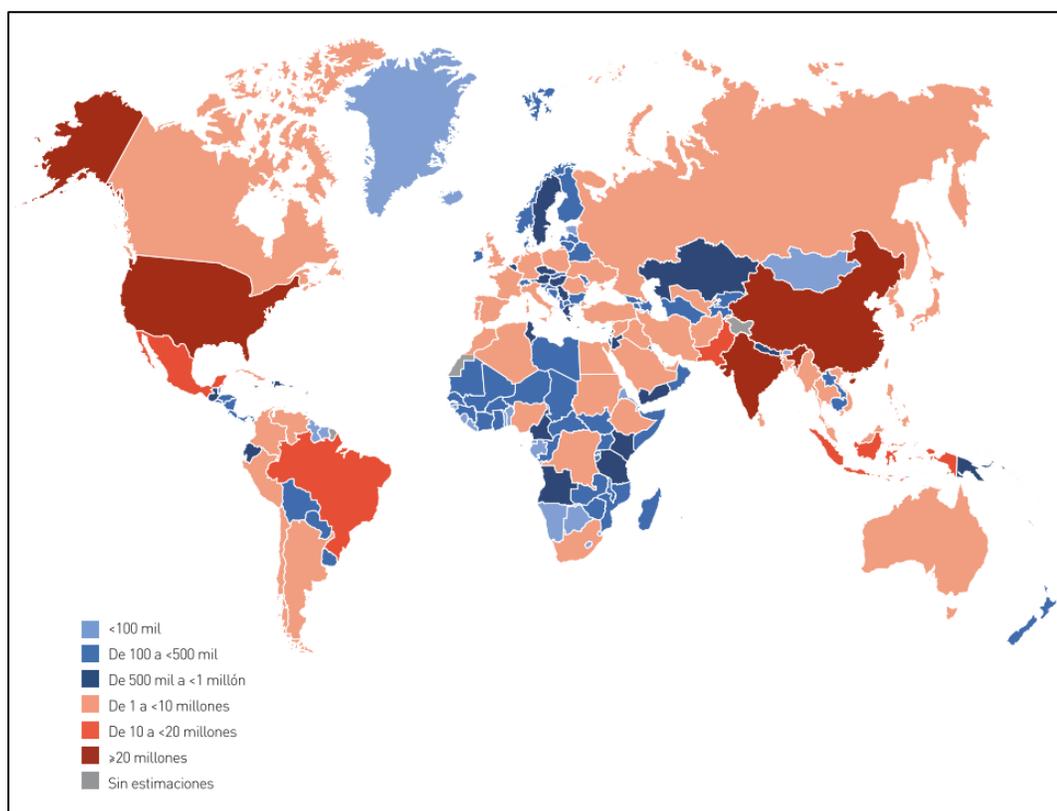


Figura 1. Mapa indicativo de la cantidad total calculada de adultos (entre 20 y 79 años) con diabetes en 2019. Tomada de IDF Diabetes atlas. 2019.

Según el *Atlas de la Diabetes* en su 9ª edición, la prevalencia calculada de esta enfermedad es mayor en hombres y va en aumento con la edad. En 2019 el número estimado de personas con diabetes entre 65 y 99 años era de 135.6 millones y se prevé un aumento en esta cifra para el 2030 a 415,4

millones y a 538.8 millones para 2045 (International Diabetes Federation, 2019). Los países con mayor número de adultos diabéticos (entre 20 y 79 años) eran China, India y Estados Unidos, se pronostica que se mantenga de este modo hasta 2030 (International Diabetes Federation, 2019).

Como se observa en la Tabla 1, México se encuentra en el noveno lugar en casos diagnosticados de diabetes (International Diabetes Federation, 2019), esta enfermedad es la principal causa de mortalidad en el país (Escobedo-De La Peña et al., 2011).

Tabla 1. Diez primeros países o territorios por cantidad de personas mayores de 65 años con diabetes en 2019, 2030 y 2045. Tomada del Atlas de la Diabetes 9ª edición. 2019.

2019			2030			2045		
Orden	País o territorio	Cantidad de personas con diabetes (en millones)	Orden	País o territorio	Cantidad de personas con diabetes (en millones)	Orden	País o territorio	Cantidad de personas con diabetes (en millones)
1	China	35,5 (32,6–40,6) <sup>i</sup>	1	China	54,3 (49,7–62,6)	1	China	78,1 (70,9–92,3)
2	Estados Unidos	14,6 (12,5–17,1)	2	Estados Unidos	20,0 (17,1–23,4)	2	India	27,5 (20,6–38,6)
3	India	12,1 (9,0–16,4)	3	India	18,0 (13,5–24,7)	3	Estados Unidos	23,2 (19,8–27,3)
4	Alemania	6,3 (5,2–7,0)	4	Brasil	9,6 (8,6–10,9)	4	Brasil	14,9 (13,4–17,0)
5	Brasil	6,1 (5,5–6,9)	5	Alemania	7,6 (6,3–8,5)	5	Alemania	8,7 (7,2–9,8)
6	Japón	4,9 (4,0–5,7)	6	Japón	5,1 (4,1–6,0)	6	México	7,7 (4,5–10,8)
7	Federación Rusa	3,7 (2,2–4,3)	7	Federación Rusa	4,6 (2,7–5,4)	7	Pakistán	6,4 (3,0–10,0)
8	Italia	2,9 (2,6–3,3)	8	México	4,3 (2,5–5,9)	8	Japón	5,4 (4,4–6,5)
9	México	2,7 (1,6–3,8)	9	Pakistán	3,8 (1,8–5,9)	9	Turquía	4,8 (3,3–6,4)
10	Pakistán	2,6 (1,2–3,9)	10	Italia	3,4 (3,1–3,9)	10	Indonesia	4,8 (4,2–5,5)

<sup>i</sup> Los intervalos de confianza del 95% se indican entre paréntesis.

## 2.1. América del Norte y El Caribe

Se realizaron estimaciones para Canadá, México, Estados Unidos de América, 21 países y territorios del Caribe Americano. Estos estudios revelaron que en esta región existen 47.6 millones de adultos entre 20 y 79

años con diabetes, que se distribuyen mayoritariamente en áreas urbanas y países de altos ingresos, como lo son Canadá y Estados Unidos (International Diabetes Federation, 2019).

La mayoría (79.2%) de los países y territorios de esta región registran una prevalencia de esta enfermedad encima del promedio mundial (8.3%). Belice es la región con la mayor prevalencia de diabetes comparativa ajustada por edad (17.1%) seguida de las Islas Vírgenes Británicas (14.2%) y siendo Canadá, las Islas Caimán, San Martín, Bermuda y Haití las excepciones con un 7.6%, 6.8%, 6.8%, 6.7% y 6.6%, respectivamente (International Diabetes Federation, 2019).

## **2.2. México.**

A finales de los años 90 entre los adultos existía una prevalencia estimada del 7.4%, México ocupaba el noveno lugar con mayor número de casos de diabetes (Escobedo-De La Peña et al., 2011) y se espera que para el 2030 aumente hasta un 9% (Gupta & Kalra, 2015) ocupando el séptimo lugar con casi 12 millones de pacientes diagnosticados con diabetes tipo II, mientras que para 2050 dicha prevalencia se espera que alcance un 22% (Rojas-Martínez et al., 2018). Existen sectores específicos de la población que son más propensos a desarrollar esta enfermedad, ya que son grupos de individuos que cuentan con ciertos factores de riesgo relacionados al desarrollo de diabetes, como síndrome de ovario poliquístico, edad avanzada, hipertensión, dislipidemia, obesidad y sedentarismo (Gupta & Kalra, 2015).

En México, la diabetes tipo II es una de las principales causas de ceguera, insuficiencia renal crónica, hospitalizaciones y amputaciones no traumáticas, además de ser la causante del 30% de las muertes registradas anualmente (Rojas-Martínez et al., 2018). En la Tabla 2 se presentan las condiciones asociadas al diagnóstico de diabetes mellitus tipo II.

Tabla 2. Prevalencia y razón de momios de diabetes mellitus con diagnóstico previo, por características sociodemográficas en adultos, México, Ensanut MC 2016. Tomada de Rojas-Martínez et al. 2018.

Edad	Prevalencia % (IC95%)	RM cruda (IC95%)	Valor de p	RM ajustada* (IC95%)	Valor de p
20 a 39 años	1.5 (1.1-2.1)	REF			
40 a 59 años	12.4 (10.5-14.5)	9.2 (6.3-13.5)	≤0.001		
60 o más años	27.4 (23.4-31.7)	24.6 (17.3-35.1)	≤0.001		
<b>Sexo</b>					
Hombre	8.4 (7.2-9.9)	REF			
Mujer	10.3 (8.5-12.5)	1.2 (0.9-1.7)	0.121		
<b>Índice de masa corporal</b>					
Bajo peso	3.3 (1.2-8.8)	0.5 (0.2-1.4)	0.189	0.6 (0.2-2.1)	0.411
Normal	6.6 (5.3-8.3)	REF		REF	
Sobrepeso	9.8 (7.8-12.3)	1.5 (1.1-2.2)	0.014	1.5 (1.0-2.1)	0.046
Obesidad	11.1 (9.6-12.9)	1.8 (1.4-2.3)	≤0.001	1.8 (1.4-2.4)	≤0.001
<b>Hipertensión</b>					
No	5.8 (5.0-6.7)	REF		REF	
Si	29.8 (24.4-35.7)	6.9 (5.1-9.3)	≤0.001	3.6 (2.7-4.8)	≤0.001
<b>Colesterol alto</b>					
No	9.1 (7.6-10.8)	REF		REF	
Si	24.7 (20.5-29.4)	3.3 (2.5-4.4)	≤0.001	3.0 (2.2-4.0)	≤0.001
<b>Nivel socioeconómico</b>					
Bajo	8.2 (6.9-9.8)	REF		REF	
Mediano	11.5 (8.7-15)	1.4 (1.0-2.0)	0.039	1.6 (1.1-2.3)	0.017
Alto	8.7 (7.3-10.4)	1.1 (0.8-1.4)	0.643	1.1 (0.9-1.5)	0.373
<b>Área de residencia</b>					
Rural	9.3 (7.8-11.0)	REF		REF	0.543
Urbano	9.5 (8.1-11.2)	1.0 (0.8-1.3)	0.840	1.1 (0.8-1.4)	
<b>Escolaridad</b>					
Primaria o menos	15.9 (13.5-18.6)	4.7 (3.0-7.2)	≤0.001	1.9 (1.2-3.0)	0.004

Secundaria	7.0 (5.7-8.7)	1.9 (1.2-2.9)	0.004	2.1 (1.4-3.1)	≤0.001
Preparatoria	6.6 (4.7-9.1)	1.7 (1.1-2.8)	0.020	2.3 (1.4-3.7)	0.001
Superior	3.9 (2.7-5.6)	REF			
*A partir de un modelo de regresión logística múltiple que incluyó variables de ajuste, edad y sexo.					
RM: Razón de momios					
Ensanut MC 2016: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016					
REF: Valor de referencia					

### 2.3. Mortalidad

Se calcula que 4.2 millones de adultos de entre 20 y 79 años mueren anualmente como resultado de la diabetes mellitus y sus complicaciones, esto equivale a una muerte cada ocho segundos y al 11.3% de los fallecimientos a nivel mundial (International Diabetes Federation, 2019). A nivel mundial, un mayor número de muertes se asocia con la diabetes en mujeres que en hombres, con cifras de 2.3 y 1.9 millones respectivamente (International Diabetes Federation, 2019).

### 2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la diabetes mellitus puede establecerse una vez que el sujeto de estudio presenta concentraciones de glucosa en sangre iguales o mayores a 126 mg/dl, y entre 110 y 125 mg/dl en ayunas (Escobedo-De La Peña et al., 2011). El tratamiento de esta enfermedad y sus complicaciones implica un gasto económico importante para los individuos que la padecen, para sus familias y para el sistema de salud en general. Se ha estimado que en México el gasto supera los 300 millones de dólares al año (Escobedo-De La Peña et al., 2011), mientras que el sistema de salud norteamericano destina el 14% de su presupuesto anual al tratamiento de la diabetes mellitus tipo II y en Canadá supone un gasto de entre 7 y 10 billones de dólares anualmente (Conget, 2002). En la Tabla 3 se muestran las diferentes pruebas que se utilizan para diagnosticar la diabetes bajo el criterio de glucosa plasmática (American Diabetes Association, 2020).

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de la diabetes utilizando glucosa plasmática. Tomada de la revista Diabetes Care, 2020.

<b>FPG*</b> $\geq$ 126 mg/dL (7.0 mmol/L). El ayuno implica no ingesta calórica por al menos 8 hrs.
2 hrs <b>PG**</b> $\geq$ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) durante prueba de tolerancia a la glucosa oral.
<b>A1C***</b> $\geq$ 6.5% (48 mmol/mol).
<b>*FPG: prueba de glucosa plasmática en ayunas (por sus siglas en inglés).</b>
<b>**PG: glucosa plasmática.</b>
<b>***A1C: Prueba de hemoglobina A1C.</b>

## 2.5. Factores de riesgo.

Actualmente existen más de 6.4 millones de personas que viven con diabetes diagnosticada en México. Los adultos mayores de 40 años presentan una mayor posibilidad de tener diabetes mellitus diagnosticada en comparación con individuos de entre 20 y 39 años (Rojas-Martínez et al., 2018). Como se observa en la Tabla 4, las personas con sobrepeso, obesidad abdominal, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y colesterol c-HDL bajo, presentan mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad (Rojas-Martínez et al., 2018).

En particular, la acumulación de tejido adiposo visceral juega un papel importante como factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad, ya que los adipocitos intraabdominales liberan grandes cantidades de ácidos grasos no esterificados al torrente sanguíneo, el aumento en el flujo de estos ácidos grasos hacia el hígado y músculo promueve la lipotoxicidad y facilita la aparición de resistencia a insulina, afectando de manera negativa la homeostasis de glucosa (Zang et al., 2017).

Tabla 4. Prevalencia de diabetes mellitus según factores de riesgo y razón de momios de la participación independiente de cada uno de estos factores

de riesgo en la ocurrencia de diabetes. Tomada de Escobedo-De La Peña et al. 2011.

	Prevalencia (IC 95%)		Razón de momios (IC 95%)	
<b>Grupo de edad (años)</b>				
25-34	3.4	(1.8-4.9)	1.0	
35-44	6.1	(3.9-8.3)	1.69	(0.87-3.29)
45-54	15.5	(12.2-18.8)	5.45	(2.84-10.45)
55-64	22.1	(18.5-25.7)	6.83	(3.68-12.69)
<b>Sexo</b>				
Hombres	8.0	(6.3-9.7)	1.0	
Mujeres	9.7	(7.8-11.6)	1.14	(0.77-1.70)
<b>EMIACC (terciles)</b>				
I	6.6	(4.2-8.9)	1.0	
II	7.6	(5.2-10.1)	1.05	(0.55-2.02)
III	13.6	(10.7-16.5)	1.52	(0.84-2.75)
<b>Obesidad abdominal</b>				
Ausente	6.0	(4.6-7.4)	1.0	
Presente	12.6	(10.3-14.9)	1.38	(0.95-1.99)
<b>Obesidad</b>				
< 25	4.6	(3.1-6.1)	1.0	
25-29.99	8.9	(7.0-10.8)	1.02	(0.63-1.66)
≥ 30	12.8	(9.8-15.8)	1.32	(0.78-2.23)
<b>Hipertensión arterial</b>				
Ausente	7.3	(6.0- 8.5)	1.0	
Presente	21.7	(16.7-26.6)	1.48	(1.01-2.16)
<b>c-LDL (mg/dl)</b>				
< 100	8.5	(6.4-10.6)	1.0	
100-129	7.9	(5.5-10.3)	0.76	(0.46-1.26)
130-159	7.7	(5.3-10.1)	0.66	(0.41-1.07)
≥ 160	10.3	(6.2-14.3)	0.73	(0.41-1.30)
<b>c-HDL bajo</b>				
No	6.3	(5.0- 7.6)	1.0	
Sí	13.1	(10.6-15.7)	1.84	(1.22-2.76)
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>				
< 150	5.2	(4.0-6.5)	1.0	
150-199	8.8	(5.8-11.7)	1.23	(0.83-1.82)
≥ 200	14.6	(12.5-16.6)	1.95	(1.27-2.99)

En la Tabla 5 se muestran los principales factores de riesgo para desarrollar diabetes tipo II.

Tabla 5. Principales factores de riesgo para desarrollar diabetes tipo II.  
Tomada de Gupta et al. 2015.

Historial familiar de diabetes
Sobrepeso (IMC $\geq$ 25 kg/m <sup>2</sup> )
Sedentarismo
Origen étnico Afroamericano, Hispanoamericano, Nativo Americano, Asiático Americano, Islas del Pacífico.
Tolerancia a la glucosa alterada previamente diagnosticada.
Índice de filtración glomerular anormal previamente detectado.
Hipertensión ( $\geq$ 140/90 mmHg en adultos)
Colesterol HDL $\leq$ 35 mg/dL (0.9 mmol/L) y/o niveles de triglicéridos $\geq$ 250 mg/dL (2.82 mmol/L).
Historial de diabetes gestacional.
Síndrome de ovario poliquístico.

La edad también es un factor importante, ya que se estima que la secreción de insulina disminuye aproximadamente un 0.7% al año (Escobedo-De La Peña et al., 2011).

### **3. Tipos de diabetes.**

La diabetes puede ser clasificada en las siguientes categorías: prediabetes, diabetes mellitus tipo I, tipo II y diabetes gestacional.

Los paradigmas que dictaban que la diabetes tipo II ocurría únicamente en adultos mientras que el tipo I aparecía únicamente en niños, han desaparecido. Se ha demostrado que ambas enfermedades se manifiestan en la población independientemente de su edad, sin embargo es común que los adultos con diabetes tipo I no presenten los síntomas que se observan en las poblaciones jóvenes e incluso llegan a experimentar disminución temporal en la necesidad de insulina, lo que dificulta el diagnóstico inicial (American Diabetes Association, 2020). A pesar de que la diabetes mellitus tipo I se diagnostica en 1 de cada 10 individuos, el hecho de que el 50% de éstos sean en pacientes pediátricos (Conget, 2002) le confiere una importancia mayor a la que representaría numéricamente. En el caso de la diabetes mellitus de tipo II, se estima que la prevalencia alrededor del mundo aumente exponencialmente durante este siglo. Este trabajo se concentra en la diabetes mellitus tipo II, que es la de mayor ocurrencia en el mundo.

#### **3.1. Diabetes mellitus tipo II.**

Anteriormente denominada como no insulino dependiente o diabetes del adulto, es la forma más común de diabetes, ya que supone el 80-90% de todos los casos diagnosticados (Conget, 2002) y se observa más frecuentemente en adultos mayores, aunque cada vez es más común encontrar este tipo de diabetes en adolescentes y niños como consecuencia de los niveles crecientes de sedentarismo, obesidad y mala alimentación (International Diabetes Federation, 2019). La hiperglucemia presente en este tipo de diabetes es el resultado de la incapacidad de las células del cuerpo para responder correctamente a la presencia de insulina, esto se conoce como “resistencia a la insulina” (International Diabetes Federation, 2019), además, los pacientes con diabetes tipo II presentan un grupo de anormalidades asociadas con la acumulación de colesterol y ácidos grasos en las células beta del páncreas que contribuyen a su degeneración y afectan directamente la liberación de insulina estimulada por glucosa en la

mitocondria, el retículo endoplásmico y la membrana celular (Muñiz-Ramirez et al., 2021). La diabetes tipo II puede presentarse con síntomas como sed excesiva (polidipsia), orina frecuente (poliuria), visión borrosa, fatiga constante, hambre constante o pérdida de peso repentina, sin embargo, también es posible que aparezca de manera asintomática, lo que dificulta el diagnóstico oportuno y facilita la aparición de complicaciones (International Diabetes Federation, 2019) de las que hablaremos más adelante.

Tanto la diabetes tipo I como el tipo II, puede ser detectada en pacientes de bajo riesgo al hacerse una prueba de glucosa, en pacientes sintomáticos y en individuos que se realicen una prueba de glucosa bajo la sospecha de tener la enfermedad. En la Tabla 6 se presentan los criterios bajo los cuales se realizan estas pruebas.

Tabla 6. Criterios para realizar las pruebas de diabetes en adultos asintomáticos. Tomada de Care et al. 2020.

1. Las pruebas deben llevarse a cabo en adultos que presenten sobrepeso u obesidad junto con al menos uno de los factores de riesgo mencionados en la Tabla 5.
2. Pacientes con prediabetes ( $A1C \geq 5.7\%$ ) deben hacerse un chequeo anual.
3. Mujeres que fueron diagnosticadas con diabetes gestacional deben realizarse un chequeo cada 3 años.
4. Personas mayores de 45 años.
5. Si los resultados del análisis son anormales. Se deben repetir las pruebas en intervalos de al menos 3 años, considerando el riesgo y la variación respecto a los resultados iniciales.

Aún no se comprenden totalmente las causas de la diabetes tipo II, pero se sabe que existe una estrecha relación entre ésta y el sobrepeso, la obesidad y la edad avanzada, por lo que el primer paso en el tratamiento de ésta enfermedad consiste en incorporar una dieta sana y actividad física a los hábitos diarios del diabético, así como no fumar y mantenerse en un peso adecuado; si esto fracasa en controlar los niveles de glucosa en la sangre, se comienzan a administrar medicamentos antidiabéticos de manera oral, como la metformina, si esto falla, se comienza con un tratamiento conjunto, que consiste en la administración de sulfonilureas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 o análogos del péptido similar al glucagón tipo 1. Cuando la administración oral de antidiabéticos no es suficiente para controlar la

hiperglucemia, se recomienda la aplicación de inyecciones de insulina (International Diabetes Federation, 2019)

#### **4. Complicaciones.**

Más allá del control de los niveles elevados de glucosa es fundamental controlar la presión sanguínea y los niveles de lípidos en la sangre, además de elevar anualmente el control metabólico, con el fin de detectar oportunamente la aparición de complicaciones como las que veremos a continuación (International Diabetes Federation, 2019):

##### **4.1. Enfermedades cardiovasculares**

La diabetes y la hiperglicemia elevan (mediante diversos mecanismos como la resistencia a la insulina, procesos inflamatorios, disfunción endotelial y los efectos tóxicos de la glucosa en la microvasculatura) el riesgo de padecer una amplia variedad de enfermedades cardiovasculares (CVD por sus siglas en inglés), que conjuntamente representan entre un tercio y la mitad de todas las muertes de personas con diabetes, con una afeción mayor hacia mujeres y jóvenes. Además, los altos niveles de glucosa en sangre se asocian con otros factores de riesgo metabólicos subyacentes como lo son la hipertensión, dislipidemia y la obesidad abdominal, que conjuntamente representan entre un tercio y la mitad de todas las muertes de personas con diabetes, con una afeción mayor hacia mujeres y jóvenes (International Diabetes Federation, 2019).

Las CVD más frecuentes relacionadas con la diabetes son la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular, la arteriopatía periférica, que es una causa importante de amputaciones en extremidades inferiores, y la insuficiencia cardíaca congestiva, que se manifiestan como hospitalizaciones, procedimientos y muertes por síndromes coronarios agudos, infarto al miocardio, accidente cerebrovascular isquémico y hemorrágico, así como muerte súbita (International Diabetes Federation, 2019).

El riesgo de las consecuencias de una CVD, aumenta significativamente con el tabaquismo y el sedentarismo, puede reducirse significativamente si se logra disminuir la hipertensión y la hiperglicemia, así como la ingesta de medicamentos que reducen el colesterol y una dieta rica en frutas, verduras

y granos integrales, así como fibras de cereales y grasas saludables (International Diabetes Federation, 2019).

#### **4.2. Retinopatía diabética**

La retinopatía diabética, junto con el edema macular diabético, las cataratas y el glaucoma, la visión doble y la incapacidad de enfoque, son las principales causas de ceguera relacionadas con la diabetes (International Diabetes Federation, 2019).

Entre 1980 y 2008 se llevaron a cabo una serie de estudios a nivel mundial, que revelaron una prevalencia general del 35% para la retinopatía diabética en individuos diabéticos que se sometieron a retinografías, misma que aumentó con la duración de la diabetes tipo I y tipo II y se asoció con el deterioro en el control del índice glucémico y la presencia de hipertensión (International Diabetes Federation, 2019).

#### **4.3. Glicación no enzimática de proteínas y formación de productos avanzados de glicación (AGEs).**

Se sabe que la mayor parte de los daños causados por las complicaciones de la diabetes son consecuencia directa de la glicación de proteínas, es decir, la unión covalente de una azúcar con un aminoácido, que altera el funcionamiento de la proteína o lípido al que se une. El proceso de glicación se da mediante una reacción nucleofílica conocida como reacción de Maillard, que consiste una reacción en la cual azúcares reaccionan no enzimáticamente con los grupos amino libres de proteínas, biomoléculas como lípidos y DNA (Aparicio & Marlene Durán, 2016), a través de una reacción nucleofílica para formar los llamados productos de Amadori o de glicación precoz. La segunda fase consiste en una serie de reordenamientos intramoleculares y reacciones oxidativas irreversibles, que forman compuestos muy reactivos llamados productos de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés) que son capaces de producir agregación de proteínas plasmáticas, intracelulares e incluso algunas proteínas ubicadas en la matriz extracelular (Gugliucci, 2000). La aparición de diversos padecimientos como la arterioesclerosis, retinopatía, cataratas, nefropatía

diabética y algunas neuropatías son consecuencia de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) inducida por AGEs, especialmente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y superóxidos ( $-O^{\cdot-}$ ) (Muñiz-Ramirez et al., 2021), además, los AGEs están directamente relacionados con alteraciones metabólicas, daño hepático y daños vasculares que conducen a la nefropatía diabética (E. Hernández.Pérez, R. Velasco, E. Vega, 2013).

La formación de AGEs ocurre a través de una serie de reacciones químicas, como se esquematiza en la Figura 2; en la primera de ellas el grupo carbonilo de un aldehído o cetona, presente en el azúcar reductor, se une de manera no enzimática a un aminoácido libre de una proteína, lípido o DNA, de esta manera forma una base de Schiff. La segunda fase consiste en una serie de reordenamientos intramoleculares y reacciones de oxidación; estas transformaciones son dependientes de las concentraciones de glucosa, de manera que, si ésta disminuye, la reacción es reversible; de lo contrario la reacción continúa y la base de Schiff sufre un reordenamiento químico y pasa a formar los llamados Productos de Amadori o fructosamina, que son más estables. Si estas reacciones continúan desarrollándose y la hiperglicemia persiste, se acumularán los productos de Amadori y sufrirán reordenamientos químicos complejos, como oxidaciones, reducciones e hidrataciones, y formarán proteínas entrecruzadas (Fuentes et al., 2015).

Posteriormente, como producto de la de glicosilación de los productos de Amadori, se forman los dicarbonilos oxidantes glioxal y 3-deoxiglucosona, que son agentes alicantes y oxidantes capaces de catalizar nuevas reacciones de unión de glucosa a proteínas. Durante esta fase irreversible se forman productos de glicación como consecuencia de varias reacciones de glico-oxidación proteica. Este proceso puede ser catalizado por la presencia de estrés oxidativo, la auto oxidación de la glucosa, la peroxidación lipídica y la presencia de iones metálicos, aumentando así la formación post-Amadori de AGEs (Fuentes et al., 2015).

La fase final de la reacción de formación de AGEs comienza con la unión de la pirralina y de la N-carboximetil-lisina con una segunda proteína, para

formar las estructuras conocidas como puentes DOLD y GOLD, que alteran de manera irreversible, las estructuras proteicas terciarias y cuaternarias (Fuentes et al., 2015).

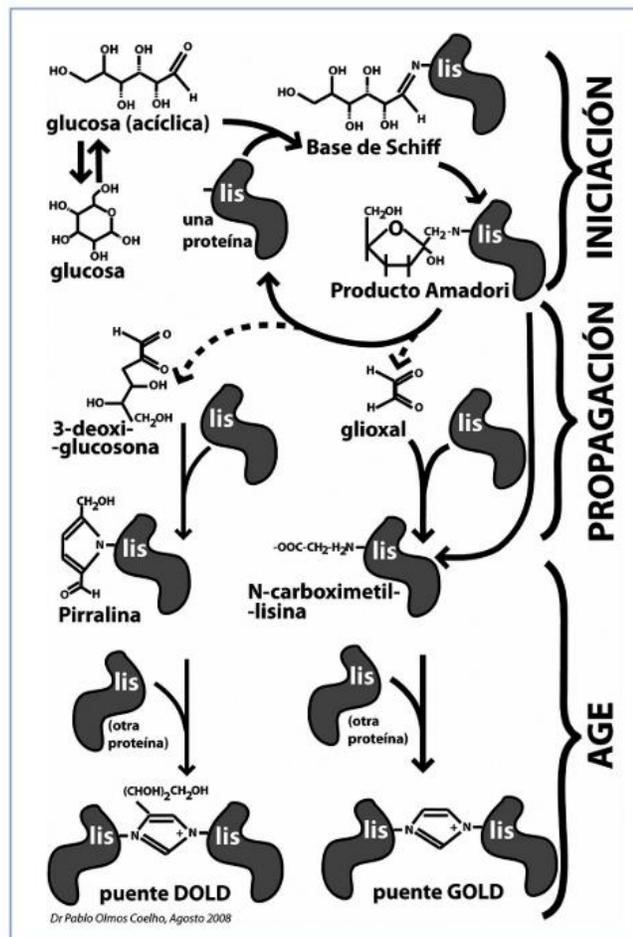


Figura 2. Formación de AGEs. (MG: Metil-glioxal, 3DG: 3-deoxiglucosona, CML; carboxi metil-lisina). Tomada de Fuentes M., et al. (2015). \*AGEs: Productos de glicación avanzada (por sus siglas en inglés).

La unión de AGEs a las proteínas intra y extracelulares, conduce a una alteración en el funcionamiento celular. Algunos de los AGEs estables identificados son la Carboxymetil-lisina-proteína, carboxietil-lisina-proteína y arginin-pirimidina-proteína; sin embargo, la cantidad y variedad de productos es muy grande y de diversas características químicas (Gugliucci, 2000). La reacción de Maillard ha demostrado causar un incremento x50 en la producción de radicales libres que oxidan azúcares y fructosaminas. Este proceso comienza con la producción de radicales  $O^{\cdot-}$  como consecuencia de

la autooxidación de azúcares y proteínas que se unen a las fructosaminas y continúa con una reacción de dismutación de los  $O^{\cdot-2}$  a  $H_2O_2$  generando radicales hidroxilo que pueden dañar proteínas y lípidos (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

Este proceso es de particular interés para este trabajo debido a que se encuentra incrementado en pacientes diabéticos, en los que se ha observado que la formación de AGEs aumenta en un grado mucho mayor que la glicemia, sugiriendo que una elevación glicémica moderada resultaría en un aumento sustancial y no lineal en la acumulación de AGEs (Gugliucci, 2000). La formación de AGEs puede ser detectada en proteínas que comúnmente están expuestas a glicación, como la estructura alfa cristalina del lente ocular o en el colágeno del tejido conectivo (Muñiz-Ramirez et al., 2021). La presencia de AGEs en la matriz extracelular modifica la funcionalidad de diversas proteínas ubicadas en ella, como se muestra en la Figura 3. En el colágeno de tipo I, la agregación molecular distorsiona la fibrilla, mientras que el estrechamiento luminal, que es una característica importante de los vasos sanguíneos en pacientes diabéticos, puede deberse en parte a la acumulación subendotelial de proteínas plasmáticas (como la lipoproteína de baja densidad o LDL, albumina e inmunoglobulina) que pueden quedar atrapadas covalentemente por los AGEs en la fibrilla de colágeno de las membranas basales. Por otra parte, la formación de AGEs en el colágeno de tipo IV de la membrana basal dificulta la asociación lateral de estas moléculas en una estructura tridimensional, resultando en la reticulación de las fibras de manera desordenada y en un aumento de la permeabilidad (Gugliucci, 2000).

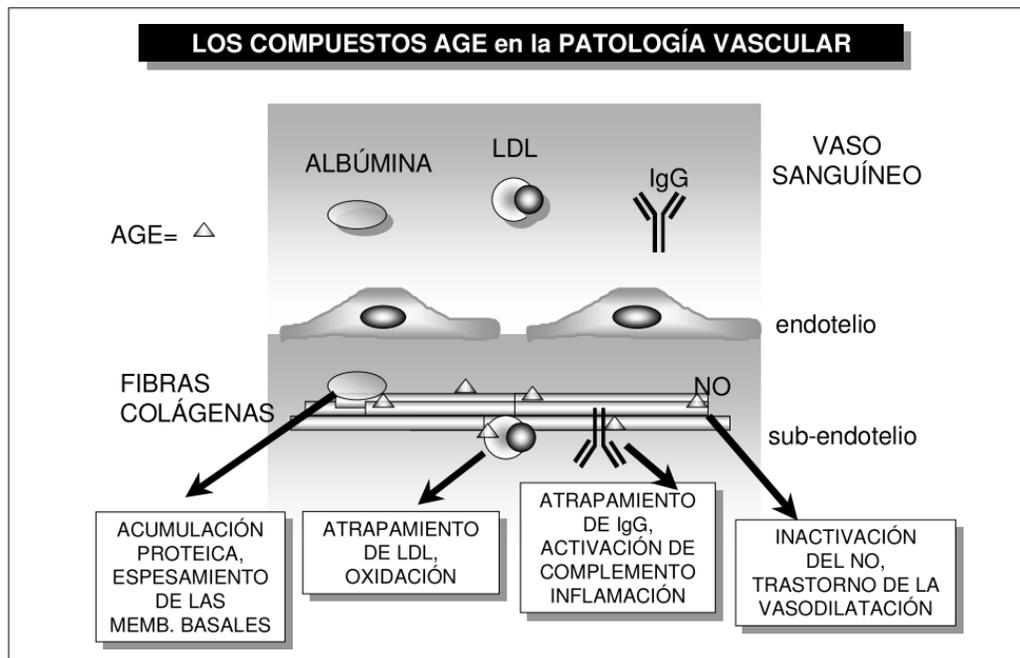


Figura 3. Productos de la glicación avanzada en patología vascular. Tomada de Gugliucci, Rev Med Uruguay (2016). \*LDL: Lipoproteínas de baja densidad (por sus siglas en inglés). \*\*IgG: Inmunoglobulina G. \*\*\*AGE: Producto de glicación avanzada (por sus siglas in inglés). \*\*\*\*NO: Óxido nítrico (por sus siglas en inglés).

En yuxtaposición con lo anterior, la formación de AGEs en una proteína estructural de la matriz extracelular, llamada laminina, interfiere en el autoensamblaje de la membrana basal glomerular y genera glomerulopatía diabética en el riñón al comprometer la integración de otros componentes estructurales importantes de esta superestructura molecular, como el colágeno de tipo IV y los proteoglicanos, específicamente el heparán sulfato proteoglicano (HSPG), cuya presencia se observa reducida en los glomérulos, unidad funcional del riñón, de personas con diabetes. Esto proporciona un sustento molecular para la patogenia de la nefropatía diabética de Kimmelstiel-Wilson, ya que estas alteraciones en la matriz extracelular de la microcirculación renal no se restringen a estos capilares, sino que están implicadas también en trastornos de capilares de retina, como la pérdida de los pericitos, que es una causa directa de la retinopatía diabética (Gugliucci, 2000).

Enfermedades como la neuropatía, arterosclerosis, retinopatía, las cataratas y la nefropatía diabética son promovidas por estos AGEs. La formación de especies ROS como  $O^{\cdot-2}$  y  $H_2O_2$ , es uno de los mecanismos de daño de los AGEs, además, la oxidación de azúcares y fructosaminas se asocian directamente con la formación de radicales libres (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

En animales diabéticos se ha observado que los AGEs provocan, además, una disminución en la elasticidad de arterias y arteriolas de manera dosis-dependiente de la inactivación de óxido nítrico, que es el vasodilatador fisiológico más potente que se conoce. Cabe destacar que la administración crónica de AGEs en ratas sanas y con niveles normales de glucosa en sangre (euglicemia) provoca glomerulosis focal, expansión mesangial y proteinuria (presencia de proteínas en la orina), es decir, provoca nefropatía diabética pero en condiciones normoglicémicas (Gugliucci, 2000).

En 2016 se demostró (Aparicio & Marlene Durán, 2016) que existe una acumulación rápida de los AGEs en las histonas de hepatocitos, que aumenta con el tiempo y la progresión de la enfermedad, lo que refuerza la idea de que la glicación avanzada ocurre también en proteínas intracelulares y plantea la posibilidad de explorar el papel de este proceso en la teratogenia asociada con diabetes mellitus. Otro ejemplo de glicación avanzada intracelular ocurre en los eritrocitos, que además de la hemoglobina glucosilada (Hb A1c), contienen hemoglobina-AGE que es una proteína que constituye el 0.24% del total de hemoglobina en individuos no diabéticos y cuya concentración es tres veces mayor en pacientes diabéticos (Gugliucci, 2000), lo que la convierte en un marcador de estado glicémico (Aparicio & Marlene Durán, 2016). La glicación por glucosa es lenta en comparación con la glicación producida por otros monosacáridos y péptidos AGE de bajo peso molecular que contienen intermediarios de la reacción de Maillard, que se encuentran en altas concentraciones plasmáticas en individuos diabéticos y que son mucho más reactivos que la glucosa. Dichos péptidos AGE son probablemente resultado del catabolismo incompleto de proteínas AGE y se encuentran en proceso de ser excretados por el riñón, por lo que son

detectados en la uremia y se les conoce como toxinas urémicas medias. El destino final de los péptidos AGE circulantes no ha sido determinado debido a que aún no se identifica una enzima capaz de mediar su catabolismo, una vez que se ha llevado a cabo la hidrólisis lisosomal de los enlaces peptídicos. Actualmente existe una gran cantidad de evidencia experimental sugiriendo que la glicación y el estrés oxidativo pueden ser vinculados a la vía de señalización del sorbitol, potenciando la producción de fructosa, que es un potente agente glicosilante (incluso más que la glucosa), y desarrollando así varias complicaciones diabéticas (Gugliucci, 2000).

#### **4.3.1. Receptores de productos avanzados de glicación y su efecto en la diabetes**

Los AGEs se relacionan con alteraciones metabólicas y daños micro y macrovasculares, neurológicos y endoteliales, los cuales implican el desarrollo de la retinopatía, enfermedades cardíacas y cerebrovasculares y principalmente, de la nefropatía diabética; sin embargo, hay que enfatizar que su participación en las complicaciones de la diabetes es solo parcial. Recientemente se ha reportado que los AGEs, al igual que ciertos factores de crecimiento y citosinas, son capaces de modular la activación de las células estelares hepáticas, la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y conducir a la fibrosis hepática (E. Hernández.Pérez, R. Velasco, E. Vega, 2013).

Los AGEs interactúan con diversos receptores conocidos como RAGEs , que es un miembro de la super familia de receptores de inmunoglobulina de superficie y cuya expresión se incrementa durante la diabetes y la inflamación. La expresión de este gen ha sido descrita en células inflamatorias y hepáticas, que son las principales estimulantes de la proliferación de la matriz extracelular durante el desarrollo de la fibrosis hepática. La interacción de AGEs con RAGE en macrófagos provoca estrés oxidante y la activación del factor nuclear kB durante la inflamación (Kislinger et al., 1999), que modula la transcripción de diversos genes y la generación de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 y el factor de necrosis tumoral alfa.(E. Hernández.Pérez, R. Velasco, E. Vega, 2013). Además, se

sabe que en el pez cebra, la incorporación de glucosa se lleva a cabo mediante transportadores GLUT 1-3, 6, 8 y 10-13 presentes en las branquias y transportadores GLUT 5 y 9 presentes en el intestino (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

Todos estos datos y las consecuencias directas de padecer alguna forma de diabetes hacen de esta enfermedad uno de los principales problemas sociosanitarios actuales a nivel mundial. Aunque la mayoría de las complicaciones de esta enfermedad derivan de la presencia de hiperglucemia en sangre, se recomienda prestar atención a todos los factores de riesgo para determinar un tratamiento efectivo, ya que se sabe que la diabetes mellitus puede no causar síntomas en los enfermos hasta muchos años después de aparecer. Por esto se recomienda a las personas con diabetes realizar un cambio en su estilo de vida y se receta en conjunto, un tratamiento farmacológico que vaya de acuerdo con sus necesidades personales.

## 5. Tratamientos para la diabetes

Para prevenir y tratar la diabetes mellitus tipo II, se recomienda alimentarse saludablemente y hacer ejercicio al menos 150 minutos a la semana. En cuanto al tratamiento farmacológico, desde 1981 la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) ha aprobado 37 medicamentos antidiabéticos que tienen la capacidad de aumentar la secreción de insulina por parte de las células beta del páncreas, la respuesta celular ante esta hormona y/o disminuir la tasa de incorporación de glucosa a las células desde el tracto gastrointestinal. Actualmente la metformina es el fármaco más recomendado ya que aumenta la eficiencia de la insulina al favorecer la traslocación de los transportadores de glucosa, aumenta la actividad de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK, por sus siglas en inglés) que se encarga de facilitar la incorporación celular de glucosa y ácidos grasos, y reduce la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), responsable de degradar incretinas, que son hormonas que ayudan a disminuir los niveles de glucosa en sangre en presencia de insulina (Zang et al., 2017). Sin embargo, en caso de intolerancia o contraindicación, se emplean algunos de los siguientes fármacos como sustitutos, dependiendo de las condiciones del paciente (Álvarez-Guisasola et al., 2019):

- Inhibidores de transportadores de sodio-glucosa tipo 2 (iSGLT2): No inducen hipoglucemia, favorecen la disminución de la presión arterial, del peso y de los niveles de ácido úrico, además previenen eventos cardiovasculares y el deterioro renal mediante la inhibición de la reabsorción tubular de glucosa.
- Inhibidores de dipeptidil peptidasa 4 (iDPP4): Disminuyen los niveles de HbA1c en sangre, evitando el aumento de peso, los riesgos cardiovasculares y además no induce hipoglucemias.
- Antagonistas del receptor del péptido similar al glucagón 1 (arGLP1): Es un fármaco anti hiperglucemiante de alta eficacia, disminuye la presión arterial, favorece la disminución de peso, la proteinuria y previene eventos cardiovasculares, además de no inducir hipoglucemia.

- Gliclacida: Es una sulfonilurea de bajo costo que disminuye los niveles de azúcar en sangre al favorecer la liberación de insulina desde el páncreas (Diseases, 2018).
- Pioglitazona: Disminuye la resistencia a insulina, los niveles de colesterol en sangre, los niveles de urea en suero y los niveles de creatinina, además tiene un efecto antiinflamatorio y alta eficacia hipoglucemiante (Wang et al., 2017).

Es importante aclarar que las principales condiciones que determinan el tratamiento adecuado son la presencia de complicaciones cardiovasculares, sobrepeso, obesidad, hipoglucemias y el estado de la función renal (Álvarez-Guisasola et al., 2019). Además, aún se debe profundizar en el estudio y comprensión de los mecanismos de resistencia a insulina y glucotoxicidad pancreática para identificar nuevos blancos farmacológicos y desarrollar medicamentos antidiabéticos. El tratamiento intensivo se enfoca en disminuir los niveles de HbA1c por debajo del 7% para disminuir la incidencia de enfermedades microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo II. La eficacia de los tratamientos orales es del 1% y el potencial hipoglicémico de la insulina se considera ilimitado, llegar a estos niveles sigue siendo muy difícil en la práctica clínica (se estima que se logra en el 60% de los pacientes) (Gomez-Peralta & Abreu Padín, 2014). En la Tabla 7 se muestra la eficacia de los fármacos hipoglicémicos que se utilizan actualmente como tratamiento para la diabetes mellitus tipo II, sin embargo, éstos están fuertemente relacionados a una serie de efectos adversos como aumento de peso o hipoglicemia, además de otros que se muestran en la Tabla 8, que presentan riesgos elevados de desarrollar complicaciones. (Gomez-Peralta & Abreu Padín, 2014).

Tabla 7. Eficacia de los fármacos hipoglicémicos utilizados actualmente en el tratamiento de la diabetes tipo II. Tomada de Gómez-Peralta *et al.* (2014).

Fármaco	Reducción esperada en HbA1c (%)
Inhibidores de alfa glucosidasa	0.5 – 0.8
Metformina	1 – 1.5
Sulfonilureas / glinidas	1.0 – 1.5
Inhibidores de DPPIV	0.7 – 1.0
Glitazonas	0.7 – 1.5
Receptores agonistas de GLP-1	0.8 – 1.2
Insulina	1.0 – 2.0
HbA1c: Hemoglobina glicosilada A1c. DPPIV: dipeptidil peptidasa. GLP-1: péptido similar al glucagón 1.	

Tabla 8. Potenciales padecimientos asociados al tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus tipo II. Tomada de Gómez-Peralta *et al.* (2014).

Potenciales complicaciones	Evitar o reconsiderar
Aumento de peso	Sulfonilureas, glinidas, insulina, glitazonas.
Síntomas gastrointestinales	Metformina, acarbosa, DPPIVs, GLP-1 ras.
Hipoglicemia	Sulfonilureas, glinidas, insulina.
Falla crónica en riñones	Metformina, sulfonilureas.
Enfermedades en el hígado	Sulfonilureas, glinidas, glitazonas.
Insuficiencia respiratoria	Metformina, glitazonas.
Fallo cardíaco	Metformina, glitazonas, insulina.
GLP-1 ras: agonistas de receptores GLP-1. DPPIVs: Inhibidores de dipeptidil peptidasa IV.	

Tomando en cuenta esto, los esfuerzos de muchos investigadores actualmente se centran en encontrar principios activos de origen vegetal que puedan coadyuvar en el tratamiento de la diabetes y otras enfermedades crónicas, ya que se ha reportado que poseen menos efectos secundarios que los de origen sintético (Lowe, 2014).

## 6. *Tillandsia recurvata*.

También llamada Heno de bola, es una especie de planta epífita angiosperma del género *Tillandsia* y del orden de las *Poales* perteneciente a la familia *Bromeliácea* (Lowe, 2014) que predomina en zonas áridas y semi áridas del continente americano desde el centro de México hasta Chile (Estrella-Parra et al., 2019); este género, crece en el dosel de algunos árboles en agrupaciones de masas esféricas de 8 cm de radio, este tipo de plantas no necesitan desarrollar un sistema vascular complejo para sobrevivir, ya que poseen tricomas foliares que les permiten atrapar y condensar la humedad del ambiente, de la lluvia y de otras moléculas orgánicas que se encuentran en la atmósfera para nutrirse, de ahí que también puedan ser encontradas creciendo en cables eléctricos y de teléfonos (Lowe, 2014). Al no establecer relaciones metabólicas con su árbol hospedero, se considera a *Tillandsia recurvata* como un parásito de espacio, ya que compite con el forofito por la luz y causa que este asigne una cantidad importante de sus recursos a la defensa contra la infestación, dejando en segundo plano su propia reproducción (Castellanos-Vargas et al., 2009).

La importancia química del género *Tillandsia* y su estudio, nació a principios del siglo XX a manos de la *American Society*, enfocándose inicialmente en sus propiedades biomedicinales (hipoglucémicas, antioxidantes, anticáncer, antiinflamatorias) hasta finales de los 60s y principios de los 70s, y posteriormente considerando la investigación para la creación de fragancias cosméticas y aceites esenciales (Estrella-Parra et al., 2019).

### 6.1. Propiedades medicinales

Las plantas del género *Tillandsia* han tenido y aún continúan teniendo diversas aplicaciones en el campo de la medicina tradicional a nivel mundial. En la Tabla 9 se enlistan los principales usos medicinales de *Tillandsia recurvata* en el continente americano. (Estrella-Parra et al., 2019).

Tabla 9. Principales usos etnomedicinales de *Tillandsia recurvata* en América. Tomada de Estrella-Parra *et al.*, 2019.

País	Uso	Parte utilizada	Referencia
Bolivia	Inflamación renal	Hoja	23
Brasil	Contra reumatismo, úlceras, hemorroides y hemorragias	Planta completa	20 - 22
México	Regulación del ciclo menstrual y alimento animal.	Planta completa	24 – 26
Uruguay	Antiespasmódico, infecciones oculares	Planta completa	27
USA	Leucorrea	Hoja	28

Por su parte, la medicina tradicional mexicana ha hecho uso de las plantas del género *Tillandsia* durante años, en la Tabla 10, se muestran los más comunes (Estrella-Parra *et al.*, 2019).

Tabla 10. Usos tradicionales y efectos farmacológicos de las plantas del género *Tillandsia* en la medicina tradicional mexicana. Tomada de Estrella-Parra *et al.*

Taxon	Uso medicinal / enfermedad	Referencia
<i>Tillandsia recurvata</i> (L.) L.	Quemaduras, tos, bronquitis, dolor de espalda, antidiurético, reumas, úlceras, hemorroides, menstruación irregular y propiedades antiangiogénicas.	Hernández <i>et al.</i> , 1991; Bennet, 2000; Sandoval-Bucio <i>et al.</i> 2004; Acevey <i>et al.</i> , 2006; De Fátima <i>et al.</i> , 2008; Hornung-Leoni, 2011; Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia aeranthes</i> (Loisel.) L. B. Sm.	Antiespasmódico e infecciones oculares	Benzing, 1980; Hornung-Leoni, 2011.
<i>Tillandsia andrieuxii</i> (Mez) L. B. Sm	Tos, bronquitis, inflamación, dolores de cabeza y espalda.	Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004; Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia balbisiana</i> Schult. f	Bronquitis	Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004; Mondragón <i>et al.</i> , 2011; Ucan 857 *(MEXU).
<i>Tillandsia duratii</i> Vis.	Cardiotónico	Acebey <i>et al.</i> , 2006.
<i>Tillandsia elongata</i> Kunth	Bronquitis	Hornung-Leoni, 2011; Ucan 711 *(MEXU)
<i>Tillandsia fasciculata</i> Sw.	Abscesos, inflamación y enfermedades del oído.	Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004; Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia guatemalensis</i> L. B. Sm.	Fiebre y padecimientos del espíritu.	Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004; Mondragón <i>et al.</i> , 2011; Breedlove *(ENCB).

<i>Tillandsia loliacea</i> Mart. Ex Schult f.	Sangrado uterino y úlceras externas.	Acebey <i>et al.</i> , 2006; De Fátima <i>et al.</i> , 2008.
<i>Tillandsia recurvifolia</i> Hook.	Propiedades medicinales.	Acebey <i>et al.</i> , 2006.
<i>Tillandsia multicaulis</i> Steud.	Propiedades medicinales.	Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia oaxacana</i> L.B. Sm	Propiedades medicinales.	Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia plumosa</i> Baker.	Propiedades medicinales.	Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia polystachia</i> (L.) L.	Propiedades medicinales.	Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004.
<i>Tillandsia prodigiosa</i> (Lem.) Baker.	Propiedades medicinales.	Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia schiedeana</i> Steud.	Dolor de cabeza y fiebre.	Bennet, 2000; Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia streptocarpa</i> Baker.	Purgante, laxante y emético.	De Fátima <i>et al.</i> , 2008.
<i>Tillandsia usneoides</i> (L.) L.	Persona tapeada, hemorroides, empache, inflamación corporal, antiepiléptico, astringente, gastritis, antipirético, tos, hernias, artritis y condiciones pulmonares.	Zamora, 2009; Bennet, 2000; Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004; Acebey <i>et al.</i> , 2006; Grijalva, 2006; De Fátima <i>et al.</i> , 2008; Mondragón <i>et al.</i> , 2011.
<i>Tillandsia streprophylla</i> Scheidw. Ex C. Morren.	Dolor de cabeza.	Sandoval-Bucio <i>et al.</i> , 2004; Ucan y Flores 929 *(MEXU).
<i>Tillandsia vernicosa</i> Baker.	Propiedades medicinales.	Acebey <i>et al.</i> , 2006.
<i>Tillandsia xiphioides</i> Ker Gawl.	Propiedades medicinales.	Bennet, 2000; Acebey <i>et al.</i> , 2006.
<p>*MEXU: El Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).  **ENCB: La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN).</p>		

Desde el punto de vista químico, se conocen alrededor de 40 compuestos con actividad biológica dentro del género *Tillandsia*, entre los cuales se encuentran los polifenoles que poseen actividad antiviral y propiedades antioxidantes, el HMG como agente hipoglucémico y la soyasaponina I como agentes anticancerígenos.

Los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por algunos organismos vivos, y aunque no son imprescindibles, tienen roles importantes

como la protección y adaptación o supervivencia en el medio que los rodea (Ramirez Rojano, 2016). Se obtienen generalmente a partir de extractos orgánicos. Entre los principales componentes químicos de las plantas del género *Tillandsia* se encuentran los terpenoides y esteroides que corresponden al 51%, mientras que los flavonoides ocupan un 45% y los ácidos cinámicos tan solo un 4%. En la Figura 4 se observan algunos de los fitoquímicos presentes en *Tillandsia recurvata* (Estrella-Parra et al., 2019) y en la Tabla 11 se resumen las aplicaciones farmacológicas de los metabolitos secundarios aislados a partir de diferentes extractos de este género (Lowe, 2014).

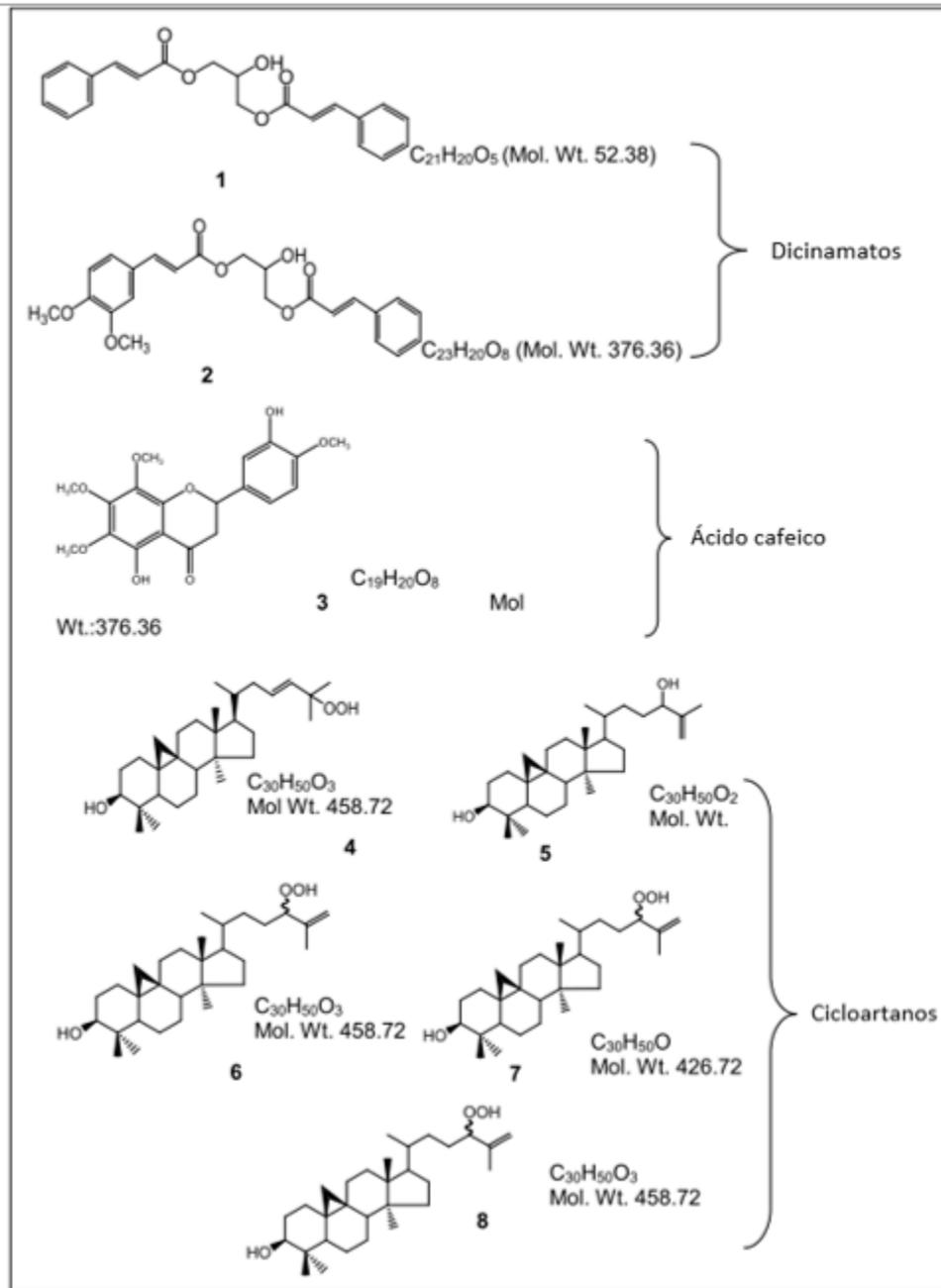


Figura 4. Principales compuestos fitoquímicos aislados a partir de *Tillandsia recurvata*. Tomada de Estrella-Parra *et al.* 2019.

Tabla 11. Actividad farmacológica de los extractos de *Tillandsia recurvata*. Tomada de Lowe *et al.* 2014.

Extracto / Compuesto	Estudio	Actividad
Extracto metanólico	Inhibición de quinasas	Kd <sub>50</sub> CSNK2A2 = 14 µg/mL. DRAK1 = 12 µg/mL. FLT3 = 12 µg/mL. GAK = 8 µg/mL. MEK5 = 12 µg/mL.
Extracto en cloroformo	Anti-angiogénesis	30 µg/mL.
Extracto en cloroformo	Citotoxicidad hacia A375 (melanoma humano) y MCF-7 (célula mamaria de humano)	IC <sub>50</sub> = 40.51 ± 10.66 µg/mL.
Extracto metanólico	Citotoxicidad hacia células PC-3 en cáncer de próstata, sarcoma Kaposi en cáncer mama, melanoma B-16 y linfoma de células beta	IC <sub>50</sub> = > 2.5 ± 4.99
Extracto con solventes orgánicos	Antimicrobial contra <i>S. aureus</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. flexneri</i> y <i>E. coli</i> .	Activo a 100 µg/mL.
Extracto acuoso	Antimicrobial contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>B. subtilis</i> .	Activo a 10 µg/mL.

Se estima que anualmente se describen alrededor de 1,600 nuevos metabolitos provenientes de plantas (Fiehn, 2002), dentro de los que existe una amplia variabilidad en cuestión de estructura y función biológica, como hemos observado, por lo que su estudio se ha convertido en un enorme reto que crea una necesidad constante de desarrollar y utilizar tecnologías y métodos que nos permitan extraerlos, estudiarlos y caracterizarlos para su aprovechamiento en farmacología y otras áreas de interés como la industria cosmética y de alimentos.

## 7. Técnicas de extracción de metabolitos secundarios.

Una gran parte de los ingredientes bioactivos de los medicamentos y alimentos que se consumen hoy en todo el mundo, provienen directamente de metabolitos secundarios producidos por plantas. Se conoce una amplia variedad de metabolitos secundarios de interés que se acumulan en partes específicas de la planta según la especie, respondiendo a esto se han diseñado diversos métodos para su extracción con solventes; estos métodos son dependientes de las características fisicoquímicas del tipo de compuestos que se desean extraer y de las aplicaciones deseadas (Starmans & Nijhuis, 1996).

### 7.1. Extracción con solventes.

Existe una amplia variedad de técnicas de extracción de metabolitos secundarios con solventes, las más utilizadas, por ser relativamente sencillas y menos costosas, son la técnica de percolado (extracción continua) y la técnica de maceración (extracción discontinua) (Jones & Kinghorn, 2012).

- Extracción continua: El solvente fluye sin interrupciones a través de la muestra, acarreando continuamente los constituyentes de la planta.
- Extracción discontinua: El solvente es añadido y retirado en repetidas ocasiones. Una vez que se equilibra la concentración de constituyentes en la planta y en el solvente, se detiene la extracción hasta que el solvente es reemplazado.

#### 7.1.1. Selección del solvente.

Se debe considerar la solubilidad de los componentes de interés, posible formación de artefactos y el grado de pureza del solvente. En la Tabla 12, se enlistan los compuestos solubles en los solventes orgánicos más comunes (Jones & Kinghorn, 2012) (Santizo Rodas, 2004):

Tabla 12. Compuestos solubles en los solventes orgánicos más comunes.

Solvente	Compuestos compatibles
Agua Ácido acético	Sales, amidas, ácidos carboxílicos, polisacáridos, saponinas, taninos, alcaloides, glucósidos, compuestos reductores.
1,4- dioxano	Amidas.
Acetonitrilo	Compuestos polares.

Metanol y etanol	Ésteres, nitruros y bromuros.
Tolueno	Compuestos aromáticos e hidrocarburos.
Acetona	Nitruros, bromuros y osazonas.
Metil y Etil acetatos	Ésteres.
Hexano	Hidrocarburos, aceites esenciales, terpenos, esteroides, carotenoides, ácidos grasos, alcaloides, gliconas, flavonoides.
Pentano y ciclohexano.	Hidrocarburos.
Cloroformo	Ácidos y cloruros.
Alcoholes	Taninos, compuestos reductores, alcaloides, aminas cuaternarias, antocianinas, flavonoides, charconas, Triterpenos.

Entre las principales técnicas de extracción de metabolitos secundarios se encuentra la extracción por percolado, extracción por fluidos supercríticos, arrastre de vapor, la extracción asistida por microondas y la extracción por macerado, que es la que se utilizó en el presente trabajo.

## **7.2. Extracción por maceración.**

Este método es el que se utiliza en este trabajo y el protocolo (Jones & Kinghorn, 2012) es el siguiente:

La muestra debe ser secada a temperatura ambiente, en un espacio con ventilación y lejos del sol para evitar la posible descomposición o transformación química de compuestos termosensibles, así como la formación de humedad no deseada. Para transportar la planta se puede congelar o preservar en alcohol. Si se muele (no pulverizar) la planta, se aumenta el área de contacto, facilitando la extracción y disminuyendo la cantidad necesaria de solvente. En la Figura 5, se esquematiza el proceso de extracción por maceración.

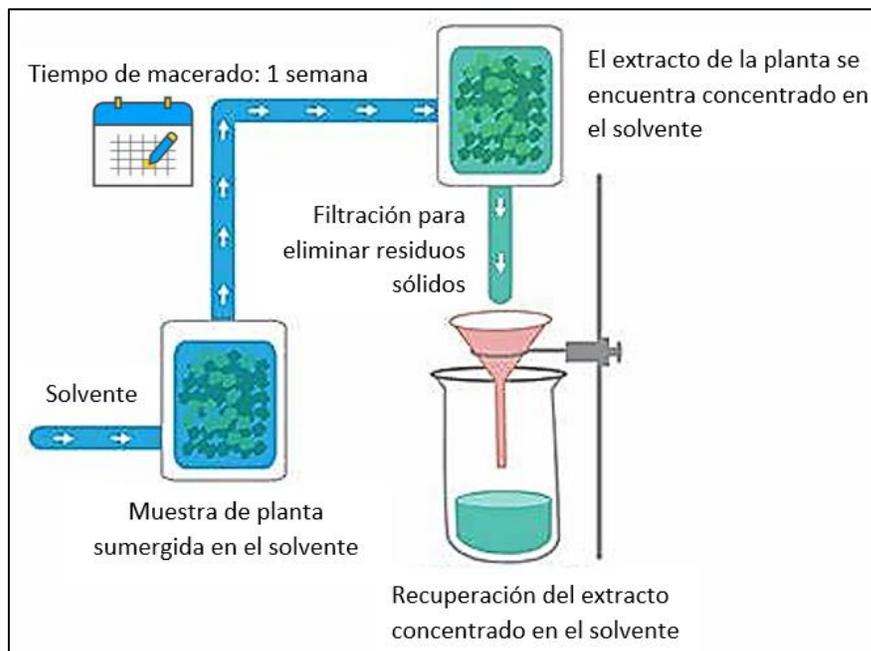


Figura 5. Esquemización del proceso de extracción de metabolitos secundarios de una muestra de planta por el método de maceración.

Una vez que se cuenta con los metabolitos secundarios concentrados en el extracto, se busca una manera eficiente de administrarlos con el fin de determinar si estos presentan la actividad biológica deseada. Respondiendo a esta necesidad, en los últimos años se han investigado y desarrollado nuevas herramientas que permitan encapsular y/o transportar fármacos o moléculas específicas dentro de un organismo. Una de estas herramientas es la aplicación de la nanotecnología en el campo de la medicina.

La investigación sobre sistemas vehículo para la entrega y transporte de principios activos dentro de un organismo ha llevado a la nanotecnología a crear acarreadores como nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, vehículos lipídicos nanoestructurados, liposomas, dendrímeros, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono y nanosuspensiones (Recepcional & La, 2016). Todos estos sistemas tienen ventajas y desventajas. El uso de nanopartículas metálicas ha despertado un gran interés dentro de la industria farmacéutica, a continuación, se presentan algunas de las razones por las cuales se clasifican como uno de los mejores

vehículos acarreadores de fármacos en la actualidad (De Jong & Borm, 2008).

## **8. Nanotecnología y Nanomedicina.**

La nanotecnología es una de las ramas de mayor interés actual para el área de la ciencia de materiales, el National Institute of Health la define como «la creación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia a escala de 1 a 100 nanómetros y la explotación de propiedades novedosas y fenómenos que ocurren a esa misma escala» (Cardeño & Londoño, 2014).

En los últimos años se ha prestado especial atención en el desarrollo de nuevos materiales y nanomateriales con propiedades que se adecúen a las necesidades específicas de cada sector. Un ejemplo de estos nanomateriales son las nanopartículas metálicas, cuya presencia puede potenciar las propiedades físicas, químicas o biológicas de un material dependiendo de su tamaño, forma y dispersión; como consecuencia de la interacción de los electrones superficiales con la radiación electromagnética y con su entorno, que le confieren propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas y catalíticas únicas (Ibáñez Hernández et al., 2020). Las nanopartículas metálicas actualmente son utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones como la industria cosmética, electrónica, química, la ciencia de materiales, sistemas acarreadores de fármacos y remediación ambiental entre otras (Zanella, 2012).

La nanomedicina es una de las ramas en las que se divide la nanotecnología y consiste en la aplicación médica de la nanotecnología para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Para lograr esto se han usado estructuras nanométricas como acarreadores de fármacos o para facilitar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades a nivel molecular (Cardeño & Londoño, 2014). Las nanoestructuras presentan una serie de ventajas en comparación con los materiales en escalas macrométricas. Muchas de estas ventajas pueden ser aprovechadas por el campo de la nanomedicina, entre las principales se encuentran las siguientes (Cardeño & Londoño, 2014)

(Ravindran et al., 2013): las nanoestructuras cuentan con una gran área superficial que puede ser funcionalizada con moléculas específicas como proteínas de reconocimiento y fármacos. Una vez funcionalizada, la nanoestructura sería capaz de atravesar la membrana celular y localizar biomoléculas o marcadores intracelulares.

Se puede hacer uso de campos electromagnéticos para calentar nanopartículas metálicas que se encuentren unidas a tejido enfermo o dañado y de esta manera destruirlo sin afectar otros órganos y tejidos que no se encuentren afectados.

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas permiten que sean utilizadas como biosensores, medios de contraste para imágenes médicas y sistemas de detección molecular.

### **8.1. Nanopartículas metálicas.**

Las nanopartículas metálicas, específicamente las de plata (AgNPs) son el tipo más utilizado de nanopartículas en productos de consumo ya que tiene propiedades antibacteriales y no presentan efectos citotóxicos importantes (Chugh et al., 2018). Se calcula que más del 30% de todos los nano-productos registrados comercialmente contienen AgNPs gracias a la estabilidad característica de la naturaleza noble de la plata, además existen agentes de recubrimiento comunes como la polivinilpirrolidona (PVP) o el polietilenglicol (PEG) que al unirse a la superficie de las nanopartículas pueden estabilizarlas por periodos largos en pH cercanos al 7.0. (Pallavicini et al., 2020)

Existen diversos métodos para sintetizar nanopartículas metálicas, las condiciones de cada método influyen directamente en el tamaño y forma resultantes. Los métodos suelen agruparse en dos categorías dependiendo del material precursor; la aproximación Top-Down y la aproximación Bottom-Up (Zanella, 2012).

#### **8.1.1. Métodos de síntesis de nanopartículas metálicas.**

Aproximación Top-Down: Consiste en obtener partículas pequeñas a partir de un sólido de mayor tamaño. Esta aproximación incluye métodos como la

molienda o el desgaste, métodos químicos y la volatilización del sólido seguido por la condensación de sus componentes volatilizados.

Existen varios métodos que utilizan esta aproximación, entre los más representativos se encuentran (Zanella, 2012):

La evaporación térmica, que consiste en calentar el material precursor hasta evaporarlo. Se lleva a cabo dentro de una cámara de vacío en donde se condensa el vapor sobre una lámina fría en la que va a ser depositado.

La molienda de partículas de tamaño micro y macrométrico utilizando molinos de alta eficiencia, las partículas resultantes se clasifican por medios físicos y solo se recuperan las de tamaño nanométrico.

El depósito químico en fase de vapor (CVD, por sus siglas en inglés), que consiste en la descomposición de uno o más compuestos volátiles dentro de una cámara de vacío, llamada reactor, cerca de la superficie de algún sólido para formar un nanomaterial que puede tener forma de partículas o de una capa delgada.

La preparación de agregados gaseosos, que utiliza un láser pulsado de alta potencia para producir vapores atómicos metálicos que son acarreados por un gas inerte y posteriormente despotados sobre un sustrato de óxido cristalino, bajo condiciones de ultra-alto vacío.

A excepción de la molienda, los métodos que utilizan la aproximación Top-Down requieren instrumentación compleja y costosa, por lo que, en muchas ocasiones, se prefieren los métodos que usan la aproximación Bottom-Up.

Aproximación Bottom-Up: Es el enfoque más utilizado en la actualidad, consiste en la fabricación de nanopartículas a través de la condensación de átomos en una fase gaseosa o solución empleando métodos químicos que comúnmente inician con la reducción de iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos. Los métodos más representativos son (Zanella, 2012):

El método de reducción química, que es el que fue utilizado en este trabajo para obtener AgNPs, consiste en disolver un precursor metálico en forma de sal u óxido, un agente reductor y un agente estabilizante en una fase líquida continua o dispersante. El tamaño promedio, la distribución de tamaños y la

forma de las nanopartículas puede ser controlada variando la concentración de los reactantes o la naturaleza del medio dispersante.

El método de síntesis fotoquímica se caracteriza por utilizar energías por debajo de los 60 eV para sintetizar nanopartículas de metales nobles a partir de sales disueltas en agua, alcohol o solventes orgánicos.

Síntesis asistida por microondas, la radiación de microondas actúa como un campo electromagnético de alta frecuencia capaz de calentar cualquier molécula polar en solución, o iones conductores en un sólido haciendo que pierdan energía al colisionar.

Utilización de dendrímeros, un dendrímero es una molécula altamente ramificada cuyo tamaño varía entre los 2 y 15 nm, estos combinan el alto peso molecular y baja viscosidad de sus soluciones y tienen la capacidad de funcionar como nanorreactores naturales. Por estas razones, los dendrímeros han demostrado ser templetos adecuados para la síntesis de nanopartículas mono-metálicas y bimetálicas de entre 1 y 2 nm.

Síntesis solvotermal, esta técnica engloba muchos métodos en los que se calienta un precursor metálico disuelto en un líquido, que generalmente es agua, por encima de su punto de ebullición generando presiones que superan por mucho una atmósfera. Por encima de los 100°C y 1 bar se llevan a cabo reacciones heterogéneas que permiten disolver reactivos que serían poco solubles en condiciones normales.

El método sol-gel es un proceso químico en fase húmeda en el que se parte de una solución precursora que atraviesa varios procesos de hidrólisis y policondensación para formar una dispersión coloidal que se polimeriza lentamente hasta formar un gel.

El método de depósito de nanopartículas en óxidos metálicos por impregnación consiste en llenar los poros de un óxido metálico que sirve como soporte con una solución precursora de la sal metálica. Una vez que se logra la interacción del precursor metálico con el soporte, se somete el material obtenido a diversos procesos térmicos en presencia de mezclas de gases reductores u oxidantes, para obtener las nanopartículas depositadas en el soporte.

El método de Adsorción iónica sobre un óxido metálico es una técnica que aprovecha la adsorción tanto de aniones como de cationes. Los cationes son adsorbidos gracias a interacciones electrostáticas entre estos y los grupos negativos que se encuentran en la superficie del soporte, siempre y cuando el pH de la solución en la que esté suspendido este, sea superior al punto isoeléctrico del mismo. Los aniones son adsorbidos en los grupos superficiales cargados positivamente cuando el pH de la solución en la que se encuentra suspendido el soporte sea inferior al punto isoeléctrico del soporte.

Técnica de Depósito-Precipitación, consiste en depositar un óxido hidratado o un hidróxido sobre la superficie de un soporte (óxido metálico) como resultado de un aumento gradual y homogéneo del pH de la solución en la que se encuentra suspendido. Comúnmente se utilizan como agentes basificantes hidróxidos de sodio o de potasio, o carbonatos y la obtención de las nanopartículas se logra sometiendo a la solución a una serie de tratamientos térmicos en presencia de gases reductores u oxidantes.

Técnica de depósito fotoquímico, esta técnica se aprovecha de que ciertos cationes metálicos pueden ser depositados sobre un soporte hecho de un óxido metálico con un “band gap” adecuado y reducidos utilizando fotoelectrones creados por la iluminación de semiconductores como el óxido de zinc o el tungsteno. Se pueden utilizar estabilizantes orgánicos para controlar el crecimiento de partículas; esta técnica no requiere de tratamientos térmicos posteriores ya que el metal en este punto se encuentra reducido por la irradiación de luz UV.

### **8.1.2. Nanopartículas metálicas como sistema de liberación de fármacos.**

Un fármaco puede ser administrado al cuerpo utilizando distintas vías anatómicas: oral, rectal, parenteral, pulmonar, transdermal o intraósea; la elección de la vía correcta depende directamente del padecimiento que se desea tratar (Jain, 2020) y la eficacia de éstos depende directamente de su concentración. Sin embargo, las técnicas utilizadas en medicina actualmente como la infusión líquida no permiten controlar la concentración del fármaco en plasma ya que existen periodos de ineficacia que no pueden ser previstos

y solo se pueden aumentar las dosis en caso de ser necesario, de esta manera se aumenta el tiempo de residencia, lo que facilita superar el umbral de toxicidad de la sustancia activa y generar efectos secundarios nocivos para el organismo (Sáez et al., 2002).

Respondiendo a esta necesidad, se busca constantemente una manera de administrar las concentraciones necesarias en el menor número de dosis posibles, por lo que el diseño de nuevos sistemas capaces de transportar y liberar fármacos de manera prolongada es actualmente una de las líneas de investigación más relevantes en el campo de la medicina. El objetivo principal es transportar el fármaco de interés y prolongar el tiempo en el que la dosis terapéutica se encuentra activa dentro del organismo (Sáez et al., 2002).

Un sistema de liberación de fármacos se define como un dispositivo capaz de introducir una sustancia terapéutica en un organismo vivo para aumentar su eficacia y seguridad al permitir controlar la ubicación, el momento y la velocidad a la que éste se libera (Jain, 2020). En este tipo de sistemas, el agente bioactivo se incorpora en un soporte que lo libera hacia el medio a una velocidad que depende tanto de las propiedades del soporte (coeficiente de difusión, solubilidad, hidrofobicidad) como de factores ambientales: el pH y la temperatura (Sáez et al., 2002), por lo que en medicina se les considera como una interface entre el paciente y el fármaco (Jain, 2020).

Como se menciona anteriormente, la tecnología de diseño de sistemas de liberación de fármacos se enfoca en disminuir la toxicidad de los medicamentos, pero también muestra gran interés en la comercialización de sustancias activas. Entre los retos más importantes se encuentra el reducir los costos de fabricación o síntesis, aumentar la vida útil del producto, mejorar los beneficios cronofarmacológicos y reducir el riesgo de fallos en el proceso de desarrollo de un nuevo producto comercial (Jain, 2020). El uso de nanopartículas metálicas como acarreadores de fármacos está enfocado en aumentar el tiempo de circulación de una molécula de interés dentro del organismo y a la orientación de células o tejidos específicos gracias a la presencia de ligandos en la superficie (Tezel et al., 2020).

### **8.1.3. Biocompatibilidad y toxicidad.**

Se entiende como biocompatibilidad a la capacidad de un material para llevar a cabo una función determinada al ser introducido como huésped dentro de un organismo vivo (Sáez et al., 2002). Los organismos vivos son capaces de identificar, rechazar o admitir cualquier agente externo que se le presente, esta interacción determina el periodo necesario para su reconocimiento y los requisitos de biocompatibilidad de un sistema de liberación dependen de las necesidades específicas de cada uno, sin embargo, hay que tener en cuenta que el entorno biológico no debe modificar de ninguna manera las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del soporte y que éste a su vez no debe inducir reacciones inflamatorias, fenómenos cancerígenos o infecciones al ser introducido (Sáez et al., 2002).

Los soportes poliméricos son ampliamente utilizados ya que permiten liberar de manera controlada sustancias bioactivas de bajo peso molecular utilizando diversas rutas de administración, sin embargo, tienen un costo muy elevado derivado del proceso de obtención del polímero y su unión al fármaco, además de que reaccionan químicamente con biomoléculas y presentan toxicidad después de períodos prolongados, formación de productos secundarios nocivos cuando el material polimérico que forma el soporte no es biodegradable o requieren una intervención quirúrgica para implantar el soporte en la localización deseada (Sáez et al., 2002), por lo que se han implementado nuevos sistemas de liberación de fármacos que incluyen geles, implantes quirúrgicos, espumas, películas delgadas, matrices de azúcares, colágeno, microesferas, nanopartículas, liposomas, eritrocitos resellados y anticuerpos (Jain, 2020).

El uso de partículas con tamaños nanométricos (20 - 300 nm) permite funcionalizar su superficie e introducirlas directamente al torrente sanguíneo o en compartimentos específicos dentro del cuerpo. En este sentido, las AgNPs son un buen sistema de liberación de fármacos, ya que cuentan con muchas de las características más importantes que debe de tener un sistema de liberación de fármacos, como lo es el control estructural sobre el tamaño y forma del soporte, biocompatibilidad, superficie funcionalizable, baja

inmunogenicidad y su síntesis es sencilla y fácil de reproducir tanto a gran escala como a escalas de laboratorio y clínicas (Jain, 2020).

La superficie de las AgNPs puede ser oxidada fácilmente por el oxígeno y otras biomoléculas presentes en su entorno, generando un aumento en la liberación de iones tóxicos de plata ( $\text{Ag}^+$ ). La oxidación de la superficie está relacionada con la exposición a la luz, el recubrimiento de la nanopartícula y las moléculas que la rodean, especialmente aquellas que contienen grupos tiol (-SH); es por eso que se relaciona directamente la toxicidad de este nanomaterial con la liberación de iones de plata a partir de su superficie (McShan et al., 2014).

Las AgNPs sufren una serie de transformaciones dentro de un ambiente biológico, y su toxicidad depende directamente de éstas, las principales son los siguientes (McShan et al., 2014):

Pérdida y desplazamiento del agente que cubre la superficie, la mayoría de estos agentes (como el ácido cítrico o aminoácidos) se encuentran unidos de manera no covalente a la superficie de la nanopartícula, por lo que al dispersar el nanomaterial en un entorno biológico éstos son desplazados y sustituidos por otras moléculas, iones e incluso pueden las nanopartículas quedar parcialmente descubiertas con tal de reestablecer el equilibrio entre los agentes que recubren la superficie y los ligandos libres presentes en el entorno, causando que el nanomaterial se vuelva inestable en el medio.

Agregación y aglomeraciones debidas al desplazamiento de los agentes que originalmente recubrían la superficie, por parte de moléculas presentes en el ambiente como el agua o iones inorgánicos.

Oxidación superficial y liberación de iones de Plata ( $\text{Ag}^+$ ). Los átomos de plata ( $\text{Ag}^0$ ) que se encuentran en la superficie de la nanopartícula pueden ser oxidados al interactuar con moléculas de oxígeno y convertirse en óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), que a su vez puede liberar  $\text{Ag}^+$  al interactuar con el medio.

El destino de las nanopartículas, su aglomeración y disolución, así como su biocompatibilidad dependen del método de síntesis que se utilizó para obtenerlas, del tipo de agentes estabilizantes que recubren su superficie y de

las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el experimento (McShan et al., 2014).

Las AgNPs pueden interactuar con proteínas de membrana y activar cascadas de señalización que intervienen en la proliferación celular, específicamente arrestar a la célula en la fase G1, G2/M y bloquear la fase S (Hsin et al., 2008), pero también pueden ser internalizadas por las células por endocitosis o difusión causando daño en proteínas, ácidos nucleicos y mitocondria, pueden también causar estrés oxidativo por un exceso en la generación de ROS e inhibir la proliferación celular (McShan et al., 2014). Además se ha demostrado (Baruwati et al., 2013) que la exposición a AgNPs altera la permeabilidad de la membrana de células intestinales y del endotelio cerebral, y estimula vías de señalización de estrés oxidativo en neuronas.

A pesar de que se ha estudiado ampliamente la toxicidad y ecotoxicidad de las AgNPs, la literatura muestra una alta variabilidad entre los reportes debido a que las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs dependen tanto del método de síntesis como de su tamaño, forma, composición superficial, funcionalización, carga superficial, concentración, reactividad, hidrofobicidad, estado de agregación y de otros factores externos como la composición del medio y el organismo en el que se estudia. La aglomeración de nanopartículas dependiendo de la concentración es un factor importante que afecta la biodisponibilidad de este nanomaterial en el medio; una vez que se han liberado en el medio, las AgNPs pueden acumular agua en su superficie, lo que les permite dispersarse de una mejor manera y formar uniones con componentes importantes del medio, por lo que al final su toxicidad dependerá tanto de sus propiedades fisicoquímicas y de la liberación de iones  $Ag^+$  que facilitan la formación de ROS, como de las condiciones particulares del medio (Tortella et al., 2020).

Una de las etapas más importantes para evaluar el efecto terapéutico de una sustancia, es el estudio de su actividad biológica y toxicología mediante ensayos *in vivo*. Esto nos permite estudiar un amplio rango de patologías humanas que incluyen desde síndromes metabólicos hasta enfermedades genéticas y adquiridas, con el fin de encontrar nuevos tratamientos (Sarras

et al., 2015). Los modelos animales con un metabolismo anormal de glucosa son muy útiles para estudiar las patologías características de enfermedades y síndromes metabólicos como la diabetes mellitus tipo II. Este tipo de modelos se desarrollan mediante alguno de los siguientes métodos: 1) deriva génica espontánea o planeada, consiste en la variación aleatoria de un gen dentro de una población pequeña y aislada; 2) inducción por dieta; 3) inducción química; 4) manipulación quirúrgica; 5) manipulación transgénica/knock-out o 6) una combinación de las anteriores (Zang et al., 2017). La mayoría de los modelos animales están basados en roedores, sin embargo, estos tienden a ser más difíciles de mantener y conllevan implicaciones éticas que no permiten hacer pruebas en grupos grandes de animales, por lo que constantemente se buscan alternativas al modelo de roedor para realizar estudios *in vivo*. Un ejemplo de esto es el caso del modelo *Danio rerio*, conocido comúnmente como pez cebra; a continuación, profundizaremos más en este modelo que en la actualidad protagoniza una gran cantidad de pruebas *in vivo* para la evaluación de nuevas sustancias terapéuticas.

## 9. Ensayos *in vivo* en modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

El modelo de pez cebra (*Danio rerio*) es uno de los más utilizados para hacer ensayos toxicológicos y de otras enfermedades o síndromes metabólicos, como la diabetes mellitus tipo II, ya que, además de ser menos costosos que modelos de mamíferos, se ha demostrado que el metabolismo de glucosa de este organismo utiliza las mismas enzimas y vías de señalización que los modelos de ratón y que el ser humano (Sarras et al., 2015). Estos peces incorporan la glucosa a través de transportadores llamados GLUT que se expresan en las branquias (GLUT 1-3, 6, 8, y 10-13) y en el intestino (GLUT 5 y 9) (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

Este modelo es más susceptible a presentar intolerancia a la glucosa que los modelos de roedor, ya que el pez cebra es capaz de desarrollar esta enfermedad en un lapso de una semana, que es muy corto en comparación con los mamíferos, quienes tardan alrededor de dos meses en presentar los fenotipos característicos de la intolerancia a la glucosa, resistencia a insulina, glicosilación de proteínas y el aumento en la cantidad de células beta pancreáticas (Zang et al., 2017). Se cree que esta susceptibilidad es consecuencia directa de los hábitos alimenticios de *Danio rerio* salvaje, ya que en su hábitat natural llevan una dieta baja en carbohidratos, alimentándose principalmente de crustáceos, plancton, larvas o gusanos (Zang et al., 2017).

El páncreas de este pez consiste en dos tipos de tejido endócrino y exocrino que regulan el metabolismo de glucosa a través de la secreción de glucagón, somatostatina e insulina directo al torrente sanguíneo; estudios previos han demostrado que la exposición a altos niveles de glucosa estimula la producción de insulina en este pez y regula negativamente la gluconeogénesis, aunado a esto, el cuerpo del embrión de pez cebra es transparente en la etapa temprana y permite realizar estudios *in vivo* de toxicidad, fluorescencia, transporte y biocompatibilidad, por lo que se considera uno de los mejores modelos para estudiar la diabetes tipo II y sus complicaciones (Campoy et al., 2018).

Tanto el adulto como el embrión del pez cebra son comúnmente utilizados para determinar la toxicidad de pesticidas, metales pesados, contaminantes ambientales, entre otros compuestos de interés actual, por lo que podemos tomar este enfoque para estudiar la toxicidad de fármacos y compuestos terapéuticos en desarrollo (Muñiz-Ramirez et al., 2021). Para evaluar la citotoxicidad de una sustancia en modelo de *Danio rerio* se debe exponer a los peces a la sustancia de interés en diferentes concentraciones durante un periodo de 96 horas y evaluar la mortalidad después de 24, 48, 76 y 96 horas. Durante este período se debe determinar la concentración de sustancia que provoque la muerte del 50% de los peces y a ésta se le da el nombre de concentración letal 50 (LC50 por sus siglas en inglés). La mortalidad de grupo control no debe exceder el 10% para que el estudio sea confiable (OECD, 1992).

## 10. Justificación

México es uno de los países con mayor número de personas que padecen diabetes, específicamente la diabetes tipo II es una de las principales causas de hospitalización en adultos. Dentro del diagnóstico de esta enfermedad se incluye una amplia variedad de fisiopatologías y situaciones clínicas que condicionan y limitan la eficacia y seguridad de los fármacos empleados en su tratamiento, mismo que implica un gran gasto económico tanto para el paciente como para el sistema de salud pública.

Como consecuencia, en los últimos años se han enfatizado esfuerzos en ampliar y mejorar las opciones terapéuticas. Uno de los fines más perseguidos de la terapia farmacológica es lograr que el principio activo de la molécula de interés llegue hasta la célula o tejido afectado para que pueda interactuar específicamente sobre él, sin perder masa, eficiencia o sufrir cambios estructurales en el trayecto.

Una de las respuestas que se han encontrado para este tipo de problemas es la implementación de vehículos acarreadores de fármacos, como las nanopartículas metálicas que, gracias a que pueden ser fácilmente manipuladas y funcionalizadas, son utilizadas como soportes o plantillas en las que se pueden anclar una gran cantidad y variedad de moléculas bioactivas con el fin de mejorar su función terapéutica al aumentar su concentración dentro de una dosis y de esta manera reducir el número de dosis necesarias.

En el presente trabajo se estudia el efecto del uso de nanopartículas metálicas como vehículo para la administración del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*, que ha demostrado disminuir los niveles de azúcar en sangre, utilizando como modelo *in vivo* a *Danio rerio*, mejor conocido como pez cebra.

## 11. Objetivos

### 11.1. -General:

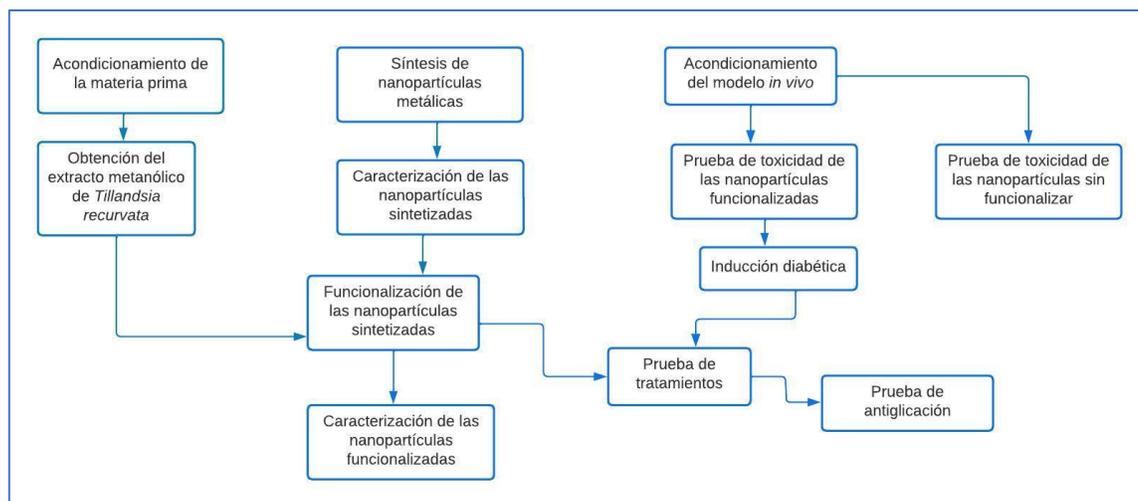
- Determinar la actividad antidiabética de nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* en un modelo de pez cebra diabético.

### 11.2. -Particulares:

- Obtención de extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*
- Síntesis de nanopartículas de plata por el método de reducción química.
- Funcionalización de las nanopartículas de plata con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.
- Caracterización de las nanopartículas de plata funcionalizadas y sin funcionalizar.
- Evaluación de la toxicidad, actividad hipoglucemiante y de antiglicación de las nanopartículas funcionalizadas con el extracto metanólico en modelo de pez cebra (*Danio rerio*) diabético.

## 12. Metodología.

### 12.1. Diagrama de flujo



### 12.2. Acondicionamiento de materia prima.

La muestra de *Tillandsia recurvata* fue recolectada en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí. La muestra seca fue sumergida completamente en metanol y se dejó macerar durante una semana. En caso de ser necesario, se añadió solvente y se removió suavemente para garantizar que se encontrara totalmente sumergida. Una vez concluido este lapso, se filtró el extracto para retirar residuos particulados y obtener únicamente el extracto disuelto en el solvente para proceder a la destilación.

### 12.3. Obtención del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

La solución de extracto en metanol se colocó en un rotavapor (marca BUCHI, modelo I- 100) para evaporar el solvente, que fue recuperado y reutilizado en futuros ciclos de macerado, mientras que el extracto fue separado y secado en una estufa de corriente de aire para su posterior almacenamiento en refrigeración a 4°C (Jones & Kinghorn, 2012) .

### 12.4. Caracterización del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* por espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada.

El extracto metanólico que se obtuvo a partir de la maceración de *Tillandsia recurvata* fue caracterizado por medio de espectroscopía infrarroja por

transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR – ATR) en el LINAN/IPICYT utilizando un espectrómetro Nicolet iS10 de la marca Thermo Fisher Scientific; con el fin de determinar los grupos funcionales que se encuentran en él y de esta manera poder aproximar los metabolitos secundarios que se obtienen a partir de la maceración en metanol.

### **12.5. Síntesis de nanopartículas de plata**

Se prepararon las siguientes soluciones en agua ultrapura de grado 1 (Mili Q):

- Solución 1: Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) disuelto en 50 mL de agua.
- Solución 2: Polivinilpirrolidona (PVP) y dodecilsulfato sódico (SDS) disueltos en 50 mL de agua.
- Solución 3: NaOH e hidracina monohidratada en 40 mL de agua.

Una vez preparadas estas soluciones, se colocó la solución 1 en una placa de agitación magnética y se añadió gota a gota la solución 2, dejando agitar por 4 minutos antes de añadir la solución 3 de la misma manera y sin suspender la agitación. Al terminar de añadir la solución 3, el color de la mezcla se tornó de un color verde grisáceo y se dejó en agitación durante 24 hrs. Una vez transcurrido este lapso, la solución fue centrifugada a 15,000 rpm durante 15 minutos y se retiró el sobrenadante para volver a suspender en agua ultrapura de tipo 1 y centrifugar un par de veces más bajo las mismas condiciones. Al terminar se suspendieron las nanopartículas en agua Mili Q y se almacenaron a 4°C (Iravani et al., 2014).

### **12.6. Funcionalización de nanopartículas de plata con extracto de *Tillandsia recurvata*.**

Se preparó una solución de 3 gramos de extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* en 20 mL de agua ultrapura de tipo 1 (10% en peso del volumen obtenido de AgNPs) y se colocó en agitación magnética durante 30 minutos para homogeneizarla. Esta solución fue agregada mediante un goteo constante a la solución de síntesis de AgNPs una vez que transcurrieron las 24 hrs en agitación después de la síntesis, y se mantuvo en agitación durante 24 hrs más (Buszewski et al., 2016)(Ravindran et al., 2013).

### 12.7. Curva de calibración

Al terminar la funcionalización de AgNPs se centrifugó la solución y se analizó el agua madre (sobrenadante) mediante espectroscopía Ultravioleta-visible en un equipo Synergy HTX multi-mode de BioTeK para determinar la cantidad de extracto que se unió a la superficie de las nanopartículas utilizando una extrapolación dentro de una curva de calibración.

Se realizó un barrido en todo el espectro UV-vis (200-700 nm) para la solución de extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* con el fin de conocer la longitud de onda en donde se presenta la máxima absorbancia. Una vez que se encontró este valor, se prepararon una serie de diluciones a diferentes concentraciones (5, 7, 9, 10, 30, 50, 60 y 80 µg/ml) con el fin de medir su absorbancia en esta longitud de onda particular y registrar los valores para obtener una gráfica sobre la que se pueden extrapolar o interpolar valores de absorbancias medidas y, utilizando la ecuación de la recta, determinar la concentración de extracto presente en la solución analizada de la siguiente manera:

$$y = mx + b$$

### 12.8. Cinética de liberación del extracto.

Para analizar la velocidad con la que el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* se libera de la superficie de las nanopartículas, se realizó un análisis de la cinética de liberación diluyendo 20 microlitros de la solución preparada de AgNPs funcionalizadas en 1 mL de agua ultrapura de tipo 1 y midiendo la absorbancia de la solución a 326 nm después durante 0.25, 0.33, 0.5, 1, 2, 3, 4, 24, 52.5 y 75.5 hrs, con el fin de detectar el cambio en la intensidad de la señal como resultado de la liberación del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

### 12.9. Caracterización por microscopía electrónica de barrido.

Se colocaron un par de gotas de la solución de AgNPs funcionalizadas y sin funcionalizar diluidas sobre un par de placas de silicio (una placa por muestra) y se dejaron secar con ayuda de una lámpara, posteriormente se montaron sobre un “pin” para microscopía electrónica de barrido (SEM) con

ayuda de una cinta de carbono de doble cara para fijar el silicio. El análisis se llevó a cabo en LINAN/IPICYT con un equipo Helios Nanolab 600 Dual Beam que trabaja a 4 mm de distancia, utilizando un voltaje de 10.000 Kv.

## **12.10. Pruebas *in vivo* usando el modelo de pez cebra (*Danio rerio*)**

### **12.10.1. Acondicionamiento del modelo *in vivo*.**

Los peces al llegar al laboratorio fueron colocados en peceras de 60 L (200 peces por pecera) y sometidos a ciclos fotoperiódicos de 14 horas de luz y 10 horas de obscuridad durante 28 días hasta que se presentó una mortalidad menor al 1 %. Durante este tiempo fueron alimentados con alimento comercial para peces tropicales de la marca Ultra Fresh, el medio se mantuvo a una temperatura de  $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y fue constantemente oxigenado a una concentración de al menos 80% del valor de saturación del aire (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

### **12.10.2. Evaluación de toxicidad**

Se llevó a cabo una prueba semi estática siguiendo los lineamientos y recomendaciones de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD por las siglas en inglés) (OECD), 1992).

Antes de realizar la prueba se separaron peces en grupos de 10 adultos y se colocaron durante 10 días en tanques de 6 L a una temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para acondicionarlos a su nuevo entorno. Los peces fueron sometidos a ciclos fotoperiódicos de 14 horas con luz y 10 horas de obscuridad y alimentados con alimento comercial para peces tropicales de la marca Ultra Fresh (Campoy et al., 2018). La prueba se llevó a cabo durante 4 días en los que cada 24 hrs se renovó el medio. El agua se mantuvo a una temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y en constante oxigenación (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

#### **12.10.2.1. Evaluación de toxicidad de las nanopartículas de plata.**

Los peces fueron divididos en grupos de 10 individuos y sometidos a las siguientes condiciones:

Las AgNPs sin funcionalizar fueron disueltas en agua de medio en cada lote a diferentes concentraciones, esta fue renovada diariamente, y se evaluó tanto la mortalidad acumulada como los signos de estrés que aparecieron en

cada grupo durante las 96 horas. Durante la prueba los peces no fueron alimentados (Campoy et al., 2018). Los grupos de peces fueron asignados de la siguiente manera:

- Grupo A (control): sin nanopartículas.
- Grupo B: 20 µg/mL de AgNPs.
- Grupo C: 40 µg/mL de AgNPs.
- Grupo D: 60 µg/mL de AgNPs.
- Grupo E: 80 µg/mL de AgNPs.
- Grupo F: 100 µg/mL de AgNPs.

Se inspeccionaron los lotes después de 24, 48, 72 y 96 horas para evaluar la mortalidad utilizando el mismo criterio del protocolo de acondicionamiento. Durante este período se tomó nota de la aparición de señales de estrés, pigmentación o alteración en la forma de nadar (Campoy et al., 2018).

Esta prueba determinó las cantidades de nanopartículas que son seguras para la administración del tratamiento.

#### **12.10.2.2. Evaluación de toxicidad de nanopartículas de plata funcionalizadas.**

Los peces fueron acondicionados y divididos en tanques de 6 L en grupos de 10 individuos y sometidos a las siguientes condiciones:

Las AgNPs funcionalizadas fueron disueltas en el agua de medio, que fue renovada diariamente, a diferentes concentraciones y se evaluó tanto la mortalidad acumulada como los signos de estrés que aparecieron durante la prueba en cada grupo. Durante esta prueba los peces no fueron alimentados (Campoy et al., 2018). Los grupos de peces fueron asignados de la siguiente manera:

- Grupo A (control): sin nanopartículas.
- Grupo B: 20 µg/mL de AgNPs funcionalizadas.
- Grupo C: 40 µg/mL de AgNPs funcionalizadas.
- Grupo D: 60 µg/mL de AgNPs funcionalizadas.
- Grupo E: 80 µg/mL de AgNPs funcionalizadas.
- Grupo F (límite): 100 µg/mL de AgNPs funcionalizadas.

Se inspeccionaron los peces después de 24, 48, 72 y 96 horas para evaluar la mortalidad utilizando el mismo criterio del protocolo de acondicionamiento. Durante este período se tomó nota de la aparición de señales de estrés, pigmentación o alteración en la forma de nadar (Campoy et al., 2018).

### **12.10.3. Inducción de hiperglucemia.**

Previo a la inducción de hiperglucemia, los peces atravesaron un período de acondicionamiento de 15 días durante los cuales fueron alimentados con alimento comercial y el agua se mantuvo en constante oxigenación a  $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , para ello se formaron grupos de 18 peces adultos y se colocaron en tanques con 6 L de agua. Transcurrido este tiempo, a los peces se les añadió una solución de glucosa 111 mM y se mantuvieron bajo esas condiciones durante 21 días. El agua se mantuvo en constante oxigenación y las soluciones de glucosa fueron renovadas cuatro veces a la semana (Campoy et al., 2018). Los peces fueron constantemente monitoreados para detectar signos de estrés como el movimiento excesivo de las branquias o dificultad para nadar. El grupo control se mantuvo en tanques de 6 L con únicamente agua, bajo las mismas condiciones de temperatura y oxigenación (Campoy et al., 2018).

Al finalizar el período de inducción, se determinó el estado diabético de los peces tomando un individuo de cada lote al azar.

### **12.10.4. Determinación del estado diabético.**

Para medir los niveles de glucosa en sangre, se sometieron los peces a un ayuno previo de 12 horas y se transfirieron a un tanque con agua durante 15 minutos. Posteriormente se tomó un individuo al azar de cada lote y se sometió a un estado de hipotermia ( $4^{\circ}\text{C}$ ) para ser anestesiado y sacrificado (Muñiz-Ramirez et al., 2021). Durante la inducción de hipotermia se prestó atención a la aparición de signos de anestesia en tercera fase, como la pérdida del balance, apertura extrema de branquias y pérdida de reacción (Muñiz-Ramirez et al., 2021), una vez alcanzada esta etapa se cortó la cola del pez y se colocó la sangre directamente sobre tiras para glucómetro de la marca One-Touch Ultra Accu Check, utilizando un glucómetro de la marca

Accu Check Active (Campoy et al., 2018). Para que un individuo de esta especie sea considerado diabético, debe presentar niveles de azúcar en sangre por encima de los 69 mg/dL (Muñiz-Ramirez et al., 2021) (Zang et al., 2018).

#### **12.10.5. Evaluación hipoglucemiante.**

Los grupos de peces inducidos con hiperglucemia fueron sometidos a diferentes tratamientos de la siguiente manera:

- Grupo A: Control sano.
- Grupo B (glucosa): Control diabético (sin tratamiento)
- Grupo C (control farmacológico): diabético + administración de glibenclamida (5 mg/L).
- Grupo D: diabético + administración de extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* (100 µg/mL).
- Grupo E (AgNPs): diabético + administración de AgNPs a una concentración de 40 µg/mL.
- Grupo F (AgNPs + Tr): diabético + administración de AgNPs funcionalizadas (60 µg/mL).
- Grupo G (AgNPs + Tr): diabético + administración de AgNPs funcionalizadas (80 µg/mL).
- Grupo H (AgNPs + Tr): diabético + administración de AgNPs funcionalizadas (100 µg/mL).

Los tratamientos mencionados fueron administrados por 14 días, durante este período los peces fueron alimentados diariamente con alimento comercial para peces tropicales de la marca Ultra Fresh y se mantuvieron a una temperatura de  $26^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y en agua con constante administración de oxígeno (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

Al terminar el período de administración de los diferentes tratamientos, se midieron los niveles de azúcar en sangre de los peces utilizando el mismo protocolo presentado en la sección de metodología para la determinación del estado diabético.

#### **12.10.6. Evaluación de la formación de productos finales de glicación avanzada.**

Se removieron los ojos de cada uno de los peces anteriormente mencionados y se colocaron en viales con 1 mL de buffer de fosfatos a pH neutro. El total del contenido de cada vial fue macerado en un mortero, la mezcla macerada fue centrifugada durante 15 minutos a una velocidad de 9,000 rpm y el sobrenadante fue recuperado para ser analizado por espectrofotometría de fluorescencia utilizando un equipo Synergy HTX de BioTeK, en el que la placa de análisis fue agitada durante 3 segundos y posteriormente irradiada con una longitud de onda de 360 nm de excitación y una de 460 nm de emisión (Muñiz-Ramirez et al., 2021).

#### **12.11. Porcentaje de inhibición.**

Para calcular el porcentaje de inhibición de formación de AGEs que tuvo cada uno de los tratamientos, se utilizó la siguiente ecuación (Muñiz-Ramirez et al., 2021):

$$\text{porcentaje de inhibición} = 1 - \left( \frac{\text{intensidad de fluorescencia con inhibidor}}{\text{intensidad de fluorescencia sin inhibidor}} \right) \times 100 \quad (1)$$

en donde la intensidad de fluorescencia sin inhibidor es la intensidad medida para el control diabético y las intensidades de fluorescencia con inhibidor son las que se registran por parte de cada uno de los grupos de peces sometidos a un tratamiento.

##### **12.11.1. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional con ayuda del software GraphPad Prism. Se compararon los diferentes tratamientos contra el control farmacológico y contra el control diabético para conocer la significancia de las diferencias entre las medias de las mediciones de cada grupo de peces. La hipótesis nula para esta prueba fue que todas las medias sean iguales, de manera que se obtuviera un resultado significativo cuando dos o más medias sean desiguales. Para determinar la significancia se utilizó un valor de **P** menor a 0.05 (Rabe-Hesketh, 2000).

### 13.Resultados.

#### 13.1. Acondicionamiento de la materia prima y obtención del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

Al terminar el proceso de extracción por macerado se obtuvieron 70 g de extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*. En la Figura 10, se observa una alícuota de 6 g que, al igual que el resto de la muestra, tiene una consistencia viscosa, de color verde muy oscuro y opaco.

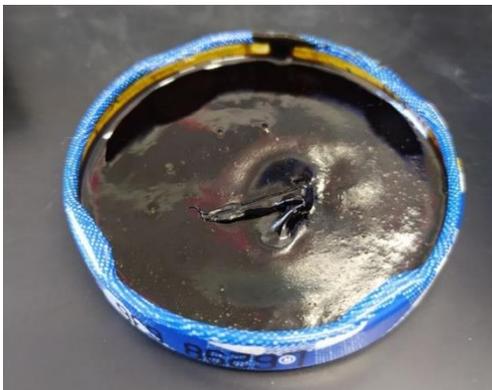


Figura 10. Aspecto del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

#### 13.2. Caracterización del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* por espectroscopía UV-vis.

Se midió el espectro UV-vis del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*, mismo que se muestra en la Figura 11. A partir de un análisis detallado de este espectro se concluyó que la señal de máxima absorbancia se encuentra alrededor de los 326 nm.

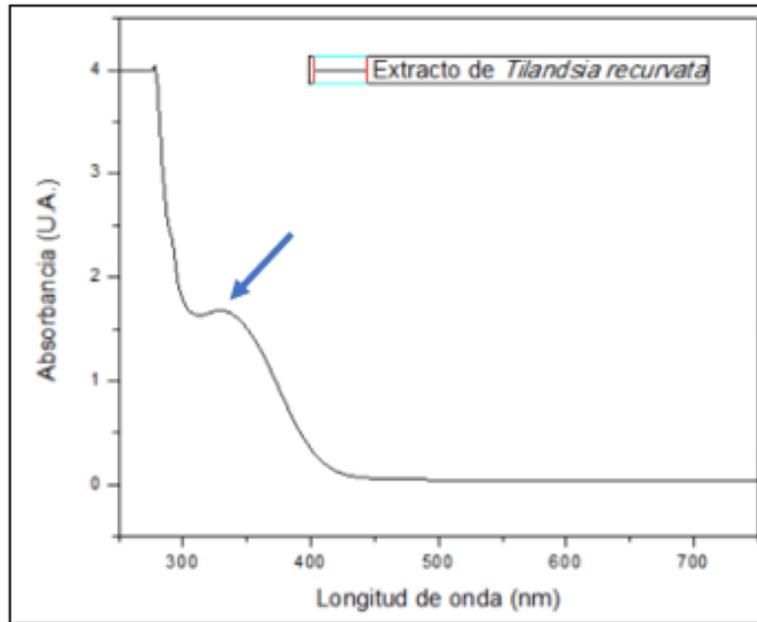


Figura 11. Espectro de absorción UV-vis registrado para el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* en solución acuosa.

### 13.3. Caracterización del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* por espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

Como resultado del análisis FTIR – ATR del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*, se obtuvo el espectro que se muestra en la Figura 12.

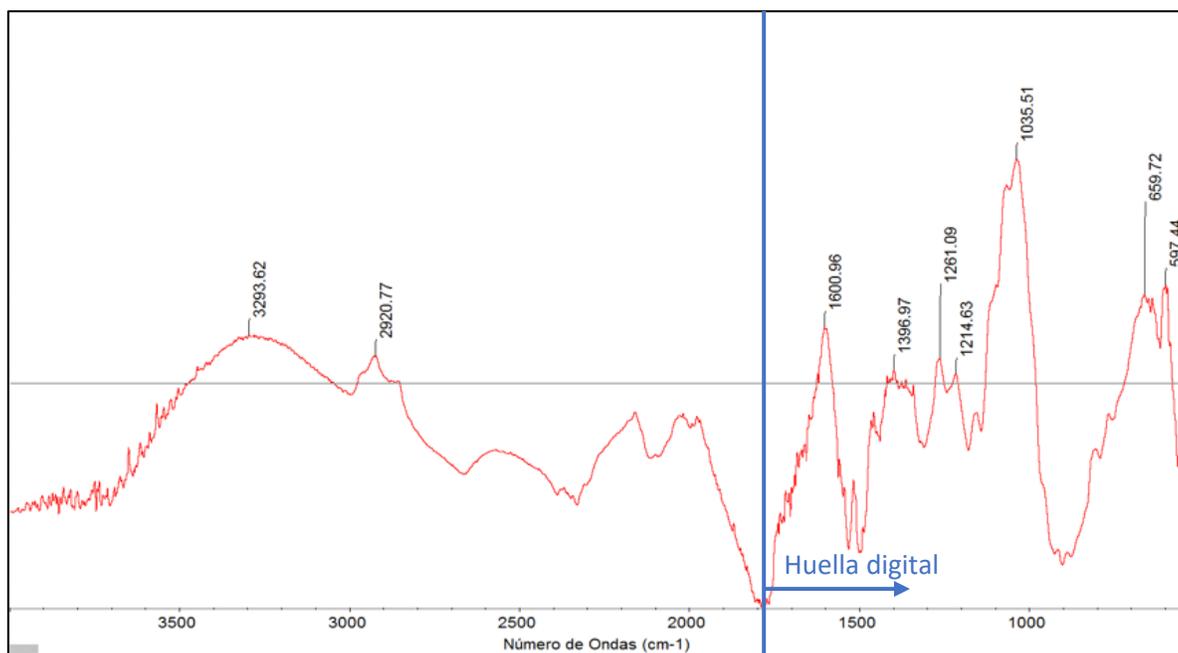


Figura 12. Espectro FTIR – ATR del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

El espectro FTIR se analizó con ayuda del software OMNIC y se identificaron nueve señales cuya intensidad sobrepasa el 50%, estas señales se reportan en la Tabla 13, junto con los grupos funcionales a los que pertenecen.

Tabla 13. Señales principales encontradas en el espectro FTIR del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* y los grupos funcionales a los que pertenecen.

Número de onda	Grupo funcional
3293.62 $\text{cm}^{-1}$	-OH: alcohol o fenol
2920.77 $\text{cm}^{-1}$	C-H: alcanos
1600.96 $\text{cm}^{-1}$	Amida I, C=C y C=O (dobles enlaces)
1396.97 $\text{cm}^{-1}$	C=C: anillos aromáticos de ácidos hidroxicinámicos
1261.09 $\text{cm}^{-1}$	C-O del Etil éster del ácido cafeico
1214.63 $\text{cm}^{-1}$	C-O del Etil éster del ácido cafeico
1035.51 $\text{cm}^{-1}$	Enlaces simples C-C, C-O
659.72 $\text{cm}^{-1}$	Compuestos aromáticos
597.44 $\text{cm}^{-1}$	C=C flexión

Las señales detectadas con este análisis coinciden con las señales características de los grupos funcionales presentes en los ácidos

hidroxicinámicos y flavononas, que son moléculas antioxidantes que se han encontrado previamente en *Tillandsia recurvata*, según lo reportado previamente (De Queiroga et al., 2004). El objetivo de este análisis fue determinar los grupos funcionales presentes en el extracto, sin embargo, se requieren estudios posteriores para identificar y aislar las moléculas responsables de la actividad antidiabética de *Tillandsia recurvata*.

#### **13.4. Síntesis de nanopartículas de plata**

Se obtuvieron 30 ml de una solución homogénea de AgNPs a una concentración de 461.5 mg/ml, que como se observa en la Figura 13 tiene un color verde grisáceo. Se le realizó espectroscopía UV-Vis con el fin de determinar mediante una comparación con la literatura, si la longitud de onda del pico de máxima absorbancia coincidía con la longitud de onda reportada para el plasmón de superficie de las AgNPs, y como observamos en la Figura 14, el espectro obtenido presenta su longitud de máxima absorbancia alrededor de los 410 nm, el cual coincide con el plasmón superficial de nanopartículas esféricas de un poco más de 50 nm de diámetro según lo reportado (Sikder et al., 2018). Esto se comprobó más adelante mediante un análisis por microscopía electrónica de barrido.



Figura 13. Aspecto de la solución de AgNPs.

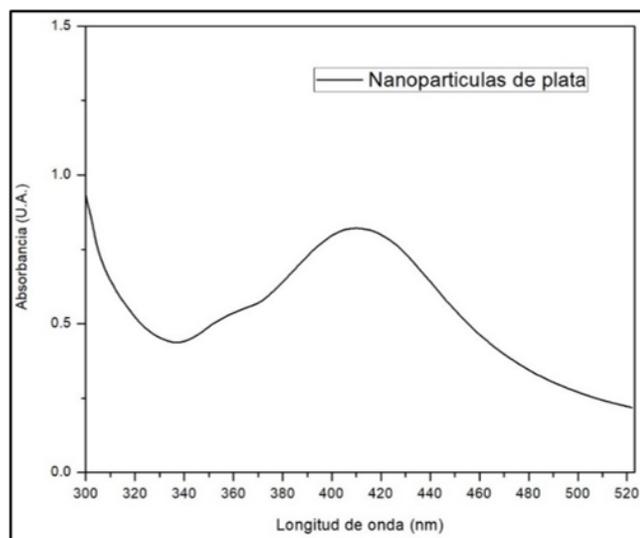


Figura 14. Espectro de Absorción UV-Vis de la solución de AgNPs.

### 13.5. Funcionalización de las nanopartículas de plata.

Se obtuvieron 50 mL de una solución homogénea de nanopartículas funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* a una concentración de 523 mg/mL. La solución tiene un color verde oscuro muy opaco, se midió su espectro de absorbancia UV-vis y como se observa en la Figura 15, la señal máxima se encontró alrededor de los 326 nm.

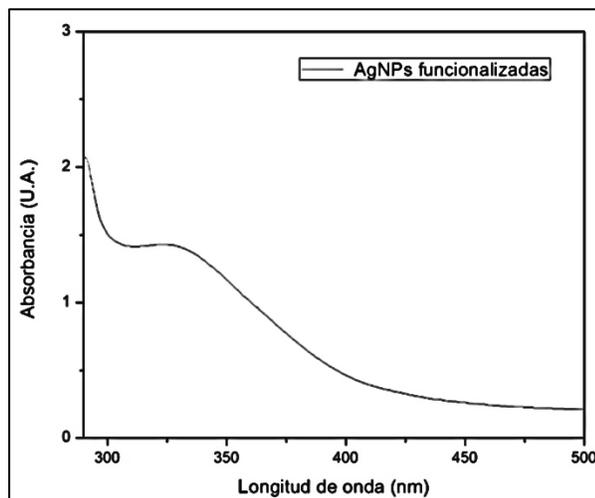


Figura 15. Espectro de absorción UV-vis registrado para las AgNPs funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

La longitud de onda del pico de máxima absorción del espectro UV-vis de las AgNPs funcionalizadas (Figura 15) coincide en longitud de onda con la señal máxima de absorción UV-vis del extracto metanólico por sí solo, por lo que podemos concluir que lo que está generando esta señal es precisamente el recubrimiento orgánico de la nanopartícula funcionalizada con el extracto de *Tillandsia recurvata*.

### 13.6. Curva de calibración

En la Tabla 14 se reportan los valores de absorción UV-vis que se obtuvieron al medir el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* a 326 nm para realizar la curva de calibración, la cual se muestra en la Figura 16 en donde se reporta también la ecuación de la recta en la que podemos observar que la pendiente tiene un valor de 14.022, también podemos observar el coeficiente de correlación  $r^2$  que, al tener un valor de 0.96, nos indica un ajuste confiable.

Tabla 14. Valores obtenidos a partir del análisis UV-vis del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* utilizados para graficar la curva de calibración.

$\lambda$ (nm)	Concentración	Abs
326 nm	0.005 mg/ml	0.203
326 nm	0.007 mg/ml	0.227
326 nm	0.009 mg/ml	0.276
326 nm	0.01 mg/ml	0.268
326 nm	0.03 mg/ml	0.492
326 nm	0.05 mg/ml	0.73
326 nm	0.06 mg/ml	0.802
326 nm	0.08 mg/ml	1.054

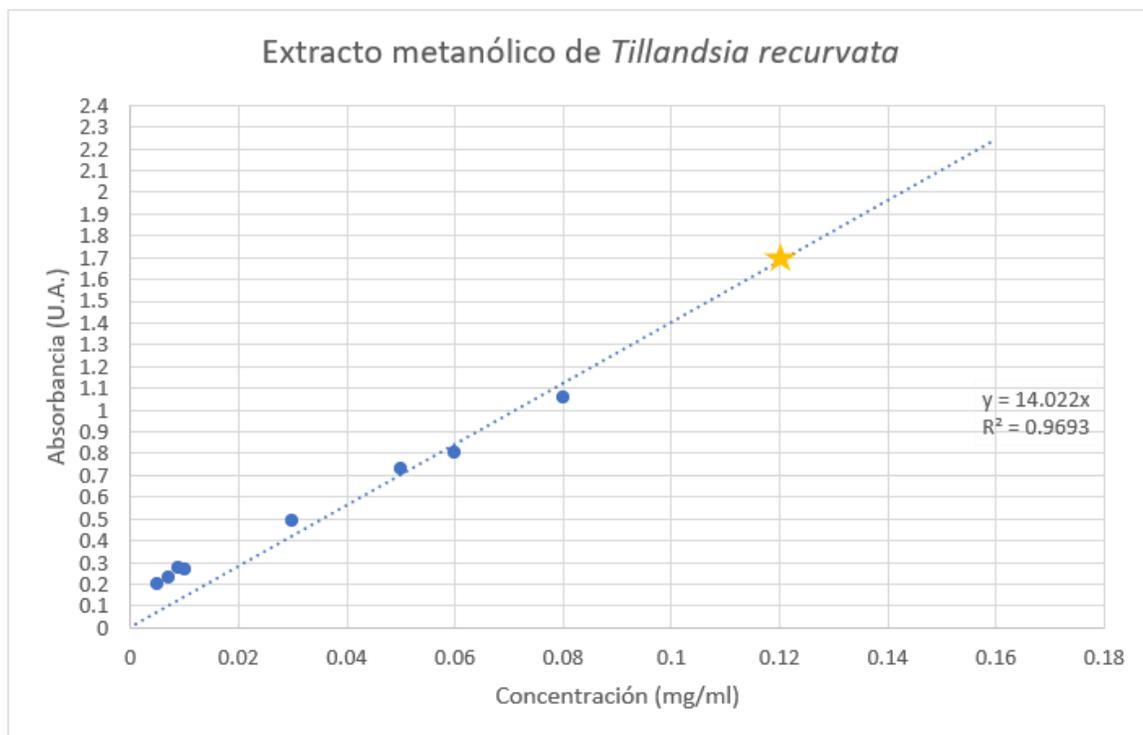


Figura 16. Curva de calibración obtenida para el extracto de *Tillandsia recurvata*.

En amarillo se marca el valor registrado por el espectrofotómetro UV-vis al medir el agua madre.

Utilizando la longitud de onda de máxima absorbancia del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* (326 nm), se analizó el agua madre y se obtuvo un valor de absorbancia de 1.682, que nos permitió calcular una concentración de  $x = 0.12$  despejando la ecuación de la recta. Esta misma concentración puede ser encontrada al extrapolar dentro de la curva de calibración graficada, como se muestra en amarillo (ver Figura 16).

Tomando en cuenta que la solución utilizada para funcionalizar las AgNPs se encontraba a una concentración de 150 mg/ml de extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*, se concluye que alrededor del 99.9% del extracto se unió a las nanopartículas.

### 13.7. Cinética de liberación.

En la Figura 17 se reporta el cambio en la absorbancia registrada a diferentes tiempos para el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* que fue liberado de la superficie de las AgNPs. Como podemos observar, los valores de absorbancia crecen rápidamente al inicio de la prueba hasta llegar al máximo alrededor de las 2.5 hrs y conforme avanza el tiempo el cambio es menos evidente hasta que llega un punto (alrededor de 30 hrs) en donde la señal comienza a disminuir como consecuencia de la precipitación de sólidos en la solución. Los valores numéricos a partir de los cuales se realizó la gráfica se reportan en la Tabla 15.

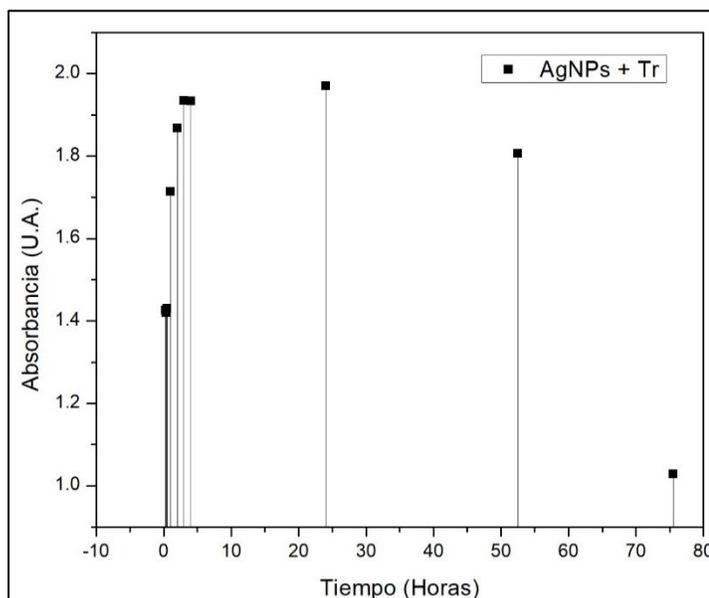


Figura 17. Gráfica de la cinética de liberación del extracto metabólico de *Tillandsia recurvata* de la superficie de las AgNPs.

Tabla 15. Valores de absorbancia medidos para la solución de AgNPs funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* en distintos tiempos de liberación.

Tiempo	Absorbancia (U.A.)
15 minutos	1.427
20 minutos	1.42
30 minutos	1.431
60 minutos	1.714
2 horas	1.868
3 horas	1.935
4 horas	1.934
24 horas	1.971
52.5 horas	1.807
75.5 horas	1.028

El aumento en la señal de absorbancia refleja un aumento en la presencia del extracto disuelto. Este tipo de curvas se conocen como cinética de liberación de primer orden y nos describen los casos en los que la velocidad de reacción depende de la concentración del fármaco en la solución y no varía de manera lineal con el tiempo (Fernando & Zhou, 2019).

### **13.8. Caracterización por microscopía electrónica de barrido.**

Mediante esta técnica de caracterización se demostró que las AgNPs tienen una forma cuasi-esférica como puede observarse en la Figura 18 y con ayuda del software ImageJ se determinó un tamaño promedio de 77 nm.

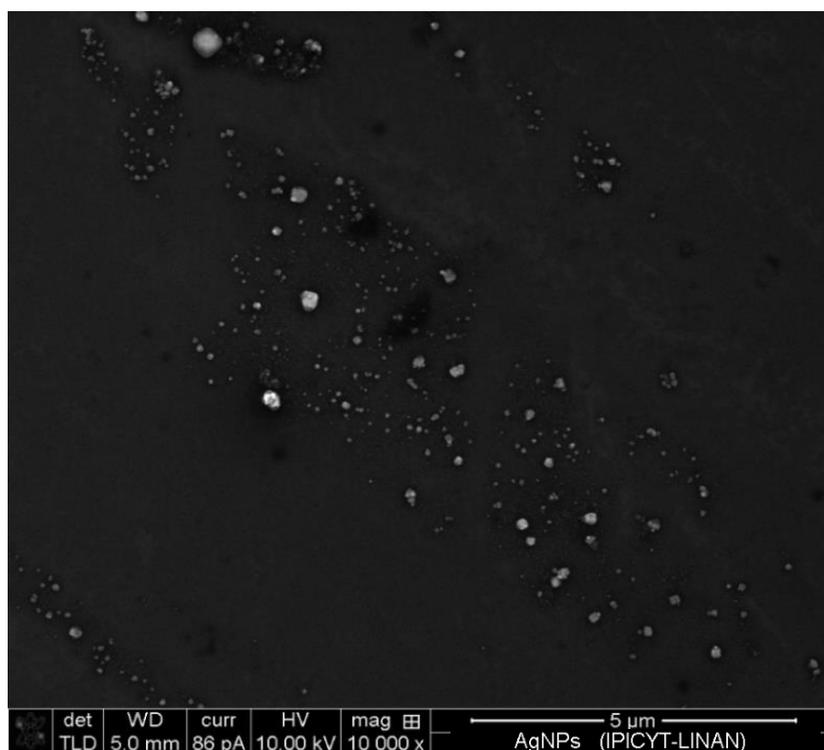


Figura 18. Micrografía SEM de las nanopartículas de plata.

Como podemos observar, tenemos una buena distribución de las AgNPs, no existe aglomeración pero sí una variación en los tamaños de partícula, lo que sugiere que existe un proceso dinámico durante la nucleación en el cual las partículas iniciales se disuelven y se reincorporan para formar partículas más grandes (Ribeiro et al., 2014).

Con ayuda del software ImageJ se determinó que las AgNPs funcionalizadas tienen un tamaño promedio de 85 nm, lo que nos indica que la funcionalización no aumenta de manera significativa el diámetro promedio, ya que hay una diferencia de 8 nm con respecto a las AgNPs sin funcionalizar. Este tamaño en promedio coincide con el tamaño que se aproximó a partir del análisis UV-vis, el cual nos indicaba un plasmón de superficie característico de AgNPs de más de 50 nm de diámetro.

En la Figura 19 se muestra una micrografía de las AgNPs funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* y podemos observar que las nanopartículas funcionalizadas tampoco presentan aglomeraciones, sin embargo, al igual que en el caso de las AgNPs sin funcionalizar, el tamaño

de partícula no es uniforme. Esto es debido a que se utilizó la misma metodología para sintetizar las AgNPs y posteriormente se funcionalizaron, lo que sugiere que durante la nucleación se presenta el mismo fenómeno que da lugar a los diferentes tamaños de partícula, probablemente como consecuencia del aumento en la temperatura causado por la constante agitación de la solución durante 24 hrs.

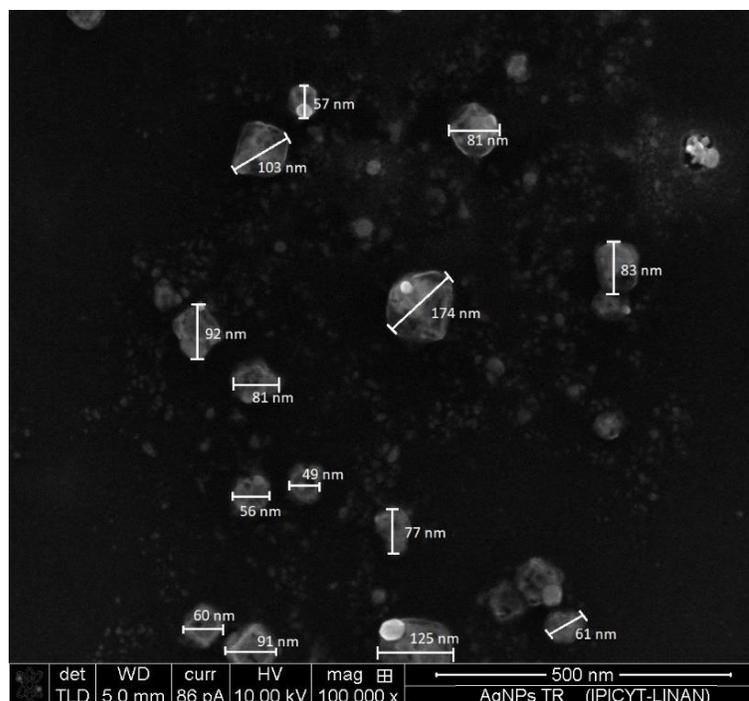


Figura 19. Micrografía SEM de las nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

### 13.9. Pruebas *in vivo* en modelo de pez cebra (*Danio rerio*).

#### 13.9.1. Prueba de toxicidad

##### 13.9.1.1. Nanopartículas de plata.

Como resultado de la prueba de toxicidad de las AgNPs se determinó que la concentración que no induce mortalidad fue la de 40 µg/mL, tal y como se observa en la Figura 20 y en la Tabla 16. También se observó que ninguna de las concentraciones utilizadas provoca una mortalidad mayor al 40%, esto indica que las nanopartículas sintetizadas tienen un alto grado de biocompatibilidad, asociado a su forma cuasi esférica y a su tamaño, ya que

se ha reportado que tanto la morfología como el tamaño de las AgNPs es un factor muy importante para su toxicidad, siendo las esféricas las menos letales, mientras que las más pequeñas (entre 5 y 20 nm) son generalmente las que provocan más muertes en modelos *in vivo* similares al utilizado en este trabajo, ya que son más fácilmente internalizadas a través de las branquias. (Hsin et al., 2008) (Osborne et al., 2015)(Nangia & Sureshkumar, 2012) (Choi & Hu, 2008).

En la Figura 20 se puede observar una gráfica de la mortalidad vs. el tiempo para cada concentración estudiada; los datos numéricos utilizados para realizar esta gráfica se presentan en la Tabla 16.

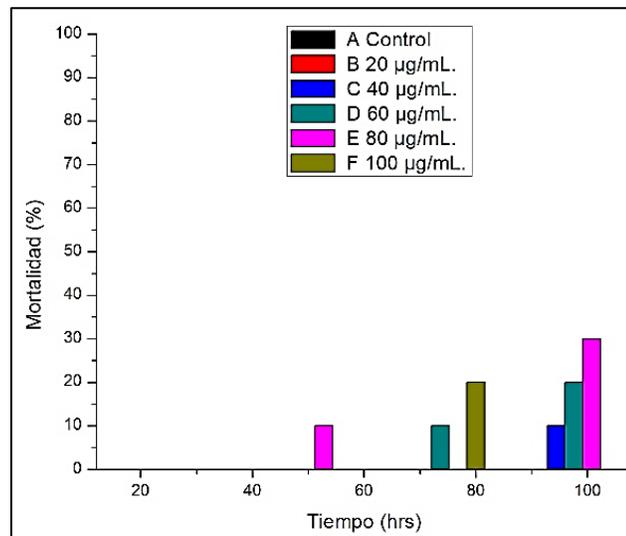


Figura 20. Mortalidad acumulada para los distintos tiempos de observación (AgNPs).

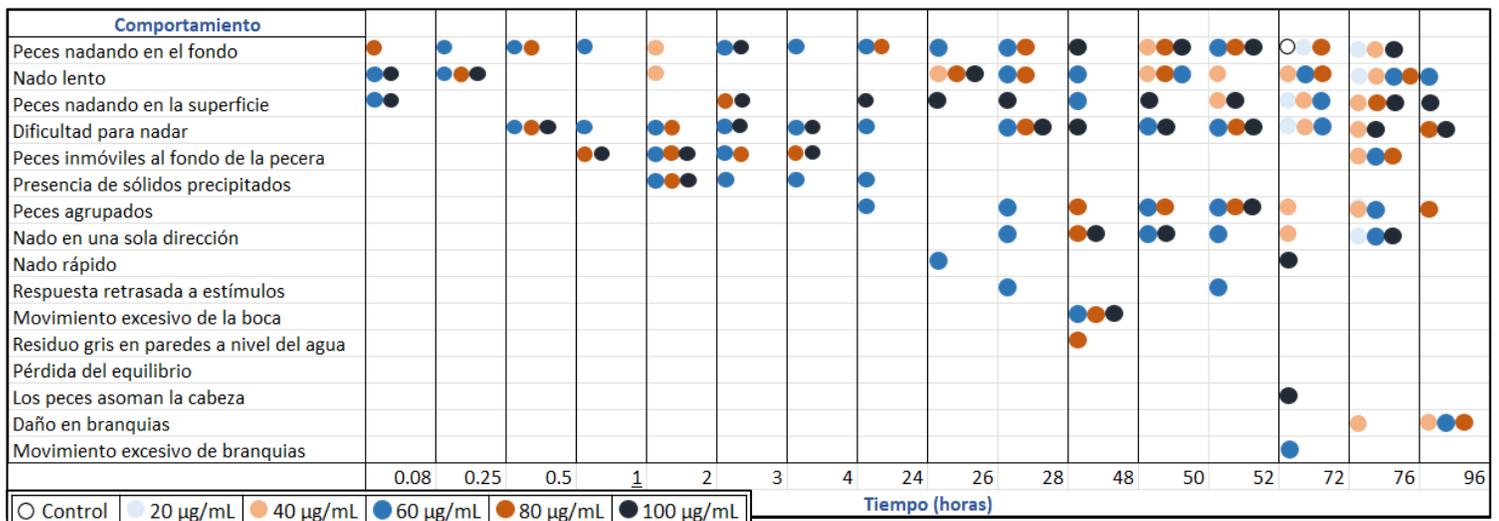
Estos resultados coinciden con lo reportado previamente (Ribeiro et al., 2014) donde concluyen que concentraciones de AgNPs mayores a 100 µg/mL provocan mortalidades mayores al 50%, mientras que concentraciones menores a 100 µg/mL resultan en mortalidades menores al 50%. En la Tabla 16 se reporta el registro de la mortalidad acumulada para los diferentes tiempos de observación durante la prueba de toxicidad de AgNPs.

Tabla 16. Registro de la mortalidad acumulada para los distintos tiempos de observación (AgNPs).

Tiempo	Mortalidad acumulada (%)					
	Control	20 µg/mL.	40 µg/mL.	60 µg/mL.	80 µg/mL.	100 µg/mL.
24 hrs	0	0	0	0	0	0
48 hrs	0	0	0	0	10	0
72 hrs	0	0	0	10	0	20
96 hrs	0	0	10	20	30	0

Durante las 96 horas de observación, se tomó nota de la aparición de signos de estrés y comportamiento anormal por parte de los peces, estos datos se reportan en la Tabla 17.

Tabla 17. Comportamiento y signos de estrés presentes durante la prueba de toxicidad de AgNPs.



Como podemos observar, las concentraciones que provocan más signos de estrés son las de 60 y 100 µg/mL, ambas provocan un nado lento en los peces inmediatamente después de administrar las dosis, mientras que la concentración que menos signos de estrés provocó fue la de 20 µg/mL, como era de esperarse. El hecho de que la concentración de 60 µg/mL indujera casi los mismos signos de estrés que la concentración límite (100 µg/mL) puede deberse a la desensibilización o pérdida de la respuesta de los

receptores farmacológicos en las membranas celulares como consecuencia de una saturación, es decir, que a partir de 80 µg/mL los peces son incapaces de internalizar más nanopartículas y se comportan de la misma manera si se les administran dosis mayores.

También podemos observar en la Tabla 18 que, al inicio de la prueba, la aparición de signos de estrés es muy lenta y conforme avanza el tiempo de exposición a las dosis, aumenta también el ritmo de aparición de comportamiento anormal en los peces, llegando a un pico máximo a las 76 hrs. También se observó que, a partir de las 72 hrs de exposición a las AgNPs, todos los peces presentan comportamiento anormal y signos de estrés, independientemente de las dosis a las que fueron expuestos. Esto es consecuencia de que el mecanismo de toxicidad de las AgNPs en organismos acuáticos está directamente relacionado con el transporte activo de iones de plata (Ag<sup>+</sup>) a través de las branquias, y a la interacción entre estos y las moléculas presentes en el medio biológico, lo que altera el sistema de regulación de iones (Nangia & Sureshkumar, 2012); además si suponemos que el nanomaterial se disuelve después de la interacción mecánica, como ha sido reportado previamente (Ribeiro et al., 2014), esto representa una liberación de iones de plata que se acumulan conforme pasa el tiempo, lo que explica el aumento de las señales de estrés y la mortalidad a mayor tiempo de exposición.

#### **13.9.1.2. Nanopartículas de Plata funcionalizadas.**

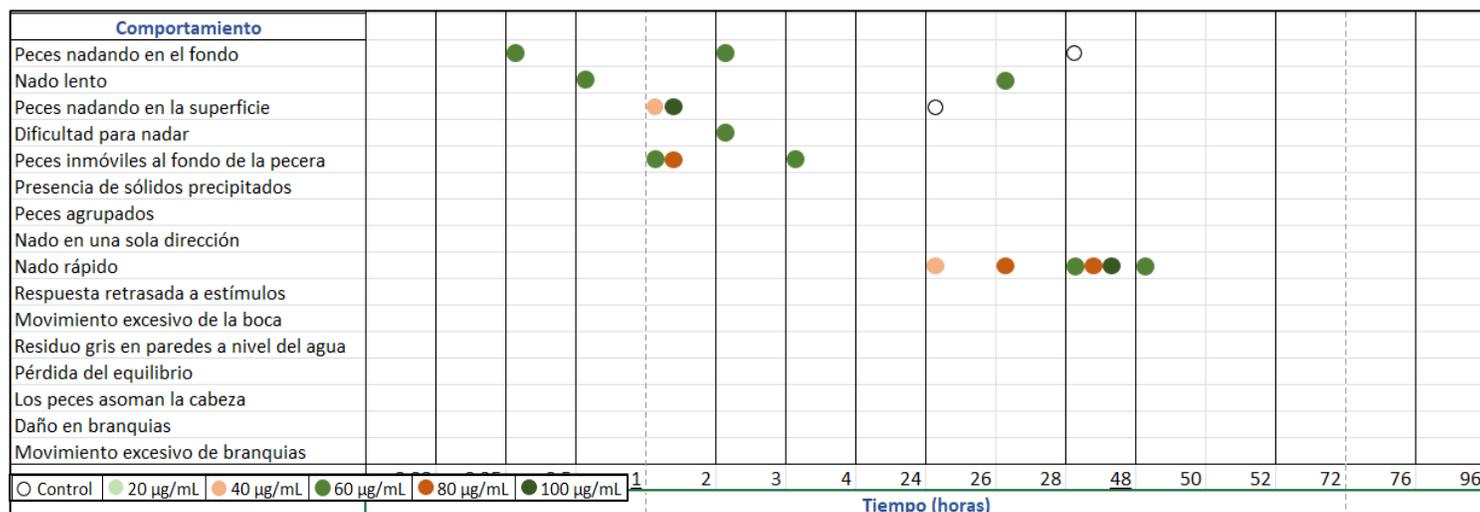
Al realizar la prueba de toxicidad de las AgNPs funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*, se observó que ninguna de las concentraciones utilizadas provocó la muerte de los peces. En la Tabla 18 se reporta la mortalidad acumulada y el tiempo de observación para cada concentración de AgNPs funcionalizadas (AgNPs + Tr) estudiada.

Tabla 18. Mortalidad acumulada para los distintos tiempos de observación (AgNPs + Tr).

Tiempo	Mortalidad acumulada (%)					
	Control	20 µg/mL.	40 µg/mL.	60 µg/mL.	80 µg/mL.	100 µg/mL.
24 hrs	0	0	0	0	0	0
48 hrs	0	0	0	0	0	0
72 hrs	0	0	0	0	0	0
96 hrs	0	0	0	0	0	0

Durante las 96 horas de observación, se tomó nota de la aparición de signos de estrés y comportamiento anormal por parte de los peces sometidos a AgNPs + Tr, estos datos se reportan en la Tabla 19.

Tabla 19. Comportamiento y signos de estrés presentes durante la prueba de toxicidad de AgNPs + Tr.



Como podemos observar en las Tablas 19 y 20, al funcionalizar las AgNPs, disminuye en gran proporción la mortalidad y los signos de estrés que se presentan en el modelo *in vivo* durante la prueba de toxicidad, por lo que se concluye que el recubrimiento orgánico disminuye considerablemente o incluso anula la toxicidad de las AgNPs, misma que, según la literatura, se debe principalmente a la liberación de iones de plata y su transporte activo a través de la membrana celular, lo que les permite interactuar directamente con biomoléculas y alterar la homeostasis celular (McShan et al., 2014); por lo que es muy probable que al recubrir las AgNPs con material orgánico se impida el contacto directo con las células, lo cual ayuda a disminuir la toxicidad ya que se ha reportado previamente que la interacción directa entre

las AgNPs y las células es uno de los principales mecanismos de toxicidad de este material. (George et al., 2012).

Aún quedan muchas preguntas sin resolver respecto al mecanismo de toxicidad de las AgNPs, aún no se determina la tasa de liberación de iones de plata al medio, su contribución a la toxicidad y se debe estudiar más a fondo la interacción de éstos con las biomoléculas dentro del organismo.

### 13.9.2. Inducción de hiperglucemia.

Nuestro equipo de trabajo reportó previamente que exponer a *Danio rerio* a concentraciones de glucosa iguales a 111 mM durante dos semanas provoca el aumento de los niveles de glucosa plasmática y de esta manera se promueve la glicosilación de proteínas en los ojos (Muñiz-Ramirez et al., 2021). Observamos resultados similares al medir los niveles de glucosa en sangre de un individuo al azar de cada lote al finalizar el período de inducción hiperglucémica. A continuación, en la Tabla 20 se presentan las mediciones obtenidas:

Tabla 20. Niveles de glucosa en sangre medidos (en promedio) para los peces al final del período de inducción hiperglucémica.

Lote	Glucosa en sangre
<b>A (sin inducción)</b>	48.33 mg/dL
<b>B</b>	91.5 mg/dL
<b>C</b>	91.67 mg/dL
<b>D</b>	92.67 mg/dL
<b>E</b>	94.33 mg/dL
<b>F</b>	95.00 mg/dL
<b>G</b>	91.00 mg/dL
<b>H</b>	93.00 mg/dL

El lote A es el control sano, es decir, el lote de peces que no fueron sometidos a la inducción hiperglucémica y a partir del lote B en adelante son los peces que si fueron expuestos a glucosa 111 mM durante 3 semanas. Para que los niveles de azúcar en sangre de un individuo de esta especie (*Danio rerio*) se consideren dentro de lo normal, deben estar por debajo de los 69 mg/dL (Zang et al., 2015) (Zang et al., 2018) por lo que, al observar la Tabla 20

podemos concluir que la inducción fue exitosa. A continuación, en la Figura 21 se muestra una gráfica generada con los datos numéricos de la Tabla 20.

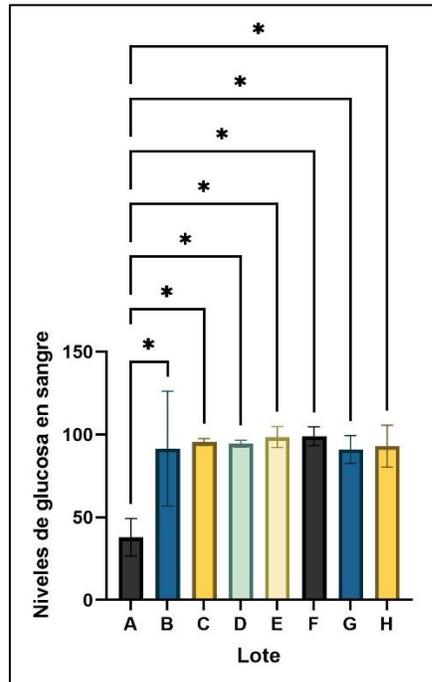


Figura 21. Niveles de glucosa en sangre para cada lote después del período de inducción hiperglucémica. Esta gráfica se construyó con los datos numéricos de la tabla 20. Se realizó un análisis de ANOVA que nos muestra con un \* los lotes que presentaron diferencias significativas, utilizando una  $P \leq 0.5$ , al ser comparados con el control sano.

En la Figura 21 se comparan los niveles de glucosa en sangre del control sano, con los niveles de glucosa en sangre de los lotes diabéticos. Como podemos observar, todos los lotes diabéticos (del B al H) presentan diferencia significativa con el control sano a una  $P \leq 0.5$ , esto nos confirma que la inducción fue exitosa y los peces presentan hiperglucemia.

### 13.9.3. Evaluación hipoglucemiante.

Al finalizar el tratamiento hipoglucemiante se midieron los niveles de glucosa en sangre para los diferentes lotes de peces y se obtuvieron los promedios que se reportan en la Tabla 21.

Tabla 21. Niveles de glucosa en sangre (en promedio) para los diferentes lotes de peces después de la administración del tratamiento. En color naranja se marcan las filas cuyos niveles de glucosa en sangre se encontraban fuera del rango normal ( $\leq 69$  mg/dL).

Tratamiento administrado	Niveles de glucosa en sangre
Control sano	53.33 mg/dL
Control diabético	95.25 mg/dL
Glibenclamida 5 mg/mL (control farmacológico)	59.25 mg/dL
Extracto metanólico de <i>Tillandsia recurvata</i> 100 $\mu$ g/mL	62.40 mg/dL
Nanopartículas de plata 40 $\mu$ g/mL	78.25 mg/dL
Nanopartículas de plata funcionalizadas 60 $\mu$ g/mL	76.15 mg/dL
Nanopartículas de plata funcionalizadas 80 $\mu$ g/mL	34.25 mg/dL
Nanopartículas de plata funcionalizadas 100 $\mu$ g/mL	43.88 mg/dL

Podemos observar en la Tabla 21 que los niveles de glucosa en sangre para el control sano (lote A), así como para los lotes diabéticos sometidos a los diferentes tratamientos (lotes B-H) se encuentran dentro de los niveles encontrados en individuos sanos de esta especie (menor de 69 mg/dL), a excepción de los peces sometidos a AgNPs sin funcionalizar y AgNPs + Tr a 60  $\mu$ g/mL, cuyos niveles de glucosa en sangre fueron de 97.25 y 71.75 mg/dL (lotes E y F, respectivamente, marcados en naranja en la Tabla 21). También se observa que los niveles de glucosa en sangre para el control diabético (Lote B) promedian 105.25 mg/dL, lo que indica la prevalencia del estado hiperglucémico en el modelo, aun cuando se suspendió la administración de glucosa 15 días previos a la medición.

En la Figura 22 se muestra una gráfica en donde podemos observar claramente que las AgNPs funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* a una concentración de 80  $\mu$ g/mL provocan la disminución de los niveles de glucosa en sangre en una mayor proporción que el resto de los tratamientos, incluso que el control farmacológico a pesar de que este fue sometido a un tratamiento farmacológico hipoglucemiante.

Estos resultados caben dentro de lo esperado, ya que se postulaba que una dosis baja de tratamiento tendría menos eficacia que una dosis alta del mismo, así como se esperaba que el lote sometido a AgNPs sin funcionalizar no presentara una diferencia significativa con el control diabético. Para profundizar más en estos resultados se presenta a continuación, un análisis estadístico de varianzas para los diferentes tratamientos probados.

Como resultado del análisis ANOVA unidireccional que se realizó comparando los diferentes tratamientos estudiados con el control diabético se obtuvieron los siguientes resultados (ver Tabla 22):

Tabla 22. Resultados estadísticos de la prueba de varianza (ANOVA) comparando el control diabético con los tratamientos estudiados.

Comparación	<i>F</i>	Significancia	<i>p</i>
Control diabético vs. Control sano	31.33	*	0.0141
Control diabético vs. Control Farmacológico	26.33	*	0.0437
Control diabético vs. Extracto 100 µg/mL.	23.00	No	0.0899
Control diabético vs. AgNPs 40 µg/mL.	14.00	No	0.4724
Control diabético vs. AgNPs + Tr 60 µg/mL.	13.67	No	0.4959
Control diabético vs. AgNPs + Tr 80 µg/mL.	55.67	****	<0.0001
Control diabético vs. AgNPs + Tr 100 µg/mL.	37.33	**	0.0035

Donde *F* representa la variación entre las medias, y *p* representa el valor de probabilidad resultante. En color azul se marca el valor más alto de *F* mientras que en color lila se marcan los valores de *p* que entran en el rango esperado ( $\leq 0.005$ ). Cada uno de los asteriscos representa la significancia de las diferencias entre las medias de los datos comparados.

El valor de *F* mide la significancia del modelo en general, no solo de una variable, de manera que entre mayor sea su valor, el modelo será mejor, como es el caso de la comparación entre el control diabético y el lote tratado con AgNPs + Tr a 80 µg/mL marcado en azul en la Tabla 22. Por otro lado, el valor de probabilidad inicial debe definirse antes de realizar el análisis, éste nos indica que tan acertada es nuestra hipótesis nula, si asumimos

inicialmente que esta es cierta. Para modelos biológicos se utiliza siempre un  $P$  inicial  $<0.05$  de manera que, si el valor de probabilidad  $p$  resultante cae en este rango, se dice que tenemos una diferencia significativa, como son los casos de las comparaciones entre el control diabético y el control sano, el control diabético vs. el control farmacológico, el control diabético vs. el lote tratado con AgNPs + Tr a 80  $\mu\text{g/mL}$  y el control diabético vs. el lote tratado con AgNPs + Tr a 100  $\mu\text{g/mL}$ , todas estas marcados en color lila en la Tabla 22; en estos casos es seguro rechazar la hipótesis nula, es decir, rechazar que las medias comparadas sean iguales. A continuación, en la Figura 22 se muestra una gráfica comparativa de los niveles de glucosa en sangre obtenidos (en promedio) a partir de las mediciones realizadas a los diferentes lotes de peces contra los niveles de glucosa en sangre obtenidos para el control diabético.

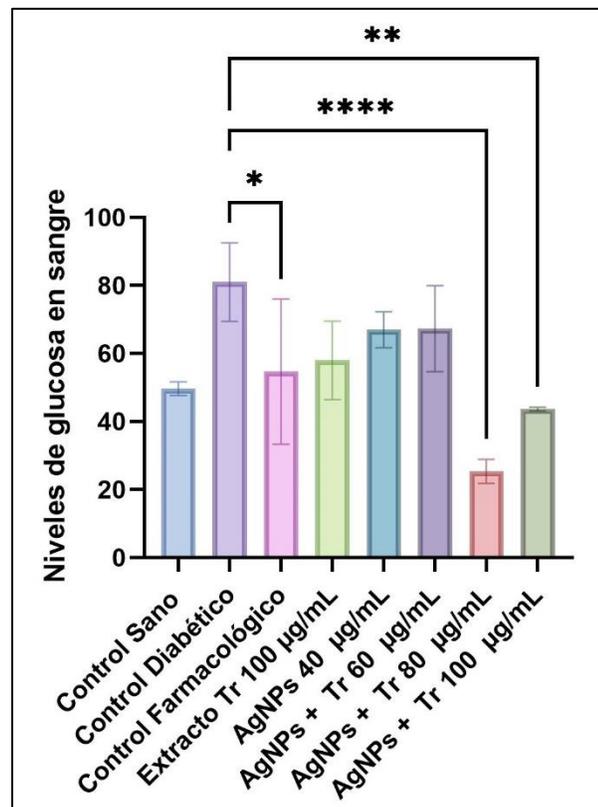


Figura 22. Niveles de glucosa en sangre para cada lote después de ser sometidos a tratamiento. Se realizó un análisis de ANOVA que nos muestra con asteriscos la significancia de las diferencias entre las mediciones de los

lotes que presentaron diferencias significativas, utilizando una  $P \leq 0.5$ , al ser comparados con el control diabético.

Podemos observar que al realizar el análisis estadístico, aparece una diferencia significativa entre el control diabético y el control farmacológico, lo cual era de esperarse, pero además aparecen diferencias significativas con los lotes de peces que fueron tratados con nanopartículas funcionalizadas a concentraciones de 80 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , siendo los niveles de glucosa plasmática de estos, menores a los del grupo de peces tratados con el extracto metanólico por sí solo e incluso mucho más bajos que los del control sano. Esto nos confirma que el utilizar AgNPs como vehículo acarreador, aumenta la actividad hipoglucemiante del extracto metanólico, muy probablemente debido a que aumenta el tiempo que tarda este en diluirse al mantenerlo unido a su superficie por varias horas, aumentando así el lapso en el que las moléculas responsables de la actividad biológica se mantienen activas y pueden interactuar con el organismo (Baruwati et al., 2013).

Ahora bien, en el caso del análisis ANOVA unidireccional que se realizó comparando los tratamientos con el control farmacológico y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 23:

Tabla 23. Resultados estadísticos de la prueba de varianza (ANOVA) comparando los diferentes tratamientos contra el control farmacológico.

Lote	F	Significancia	p
Control Farmacológico vs. Control Sano.	5.00	No	0.9894
Control Farmacológico vs. Control Diabético.	26.33	*	0.0437
Control Farmacológico vs. Extracto 100 $\mu\text{g/mL}$ .	3.33	No	0.9994
Control Farmacológico vs. AgNPs 40 $\mu\text{g/mL}$ .	12.33	No	0.5947
Control Farmacológico vs. AgNPs + Tr 60 $\mu\text{g/mL}$ .	12.67	No	0.5696
Control Farmacológico vs. AgNPs + Tr 80 $\mu\text{g/mL}$ .	29.33	*	0.0223
Control Farmacológico vs. AgNPs + Tr 100 $\mu\text{g/mL}$ .	11.00	No	0.6967

Donde  $F$  representa la variación entre las medias, y  $p$  representa el valor de probabilidad resultante.

En la Tabla 23 podemos observar que el valor más alto de  $F$  se dio al comparar el control farmacológico con el lote de peces que fueron tratados con AgNPs + Tr a una concentración de 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (marcado en azul en la Tabla 23), este valor mide la significancia del modelo, de manera que al ser este el valor más alto, se sugiere que este par comparado es el mejor modelo, es decir, el que mayor varianza presentó entre sus medias.

También se observa que los valores de  $p$  que resultaron menores a 0.05 son los arrojados por la comparación entre el control farmacológico vs. el control diabético y entre el control farmacológico vs. el lote tratado con AgNPs + Tr a 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ambos marcados en color lila en la Tabla 23), por lo que en estos dos casos es seguro rechazar la hipótesis nula, es decir, rechazar que las medias de ambas comparaciones sean iguales. A continuación, en la Figura 23 se muestra una gráfica comparativa de los niveles de glucosa en sangre obtenidos a partir de las mediciones realizadas a los diferentes lotes de peces, similar a la Figura 22 pero con la comparativa entre el control farmacológico y el resto de los tratamientos.

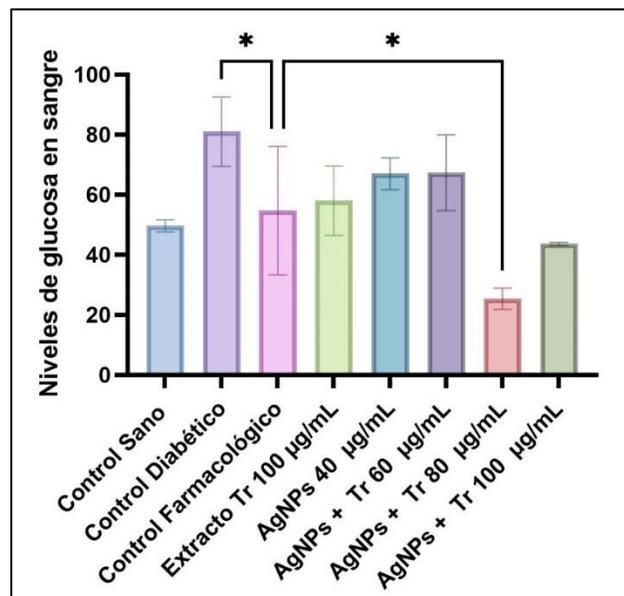


Figura 23. Niveles de glucosa en sangre para cada lote después de ser sometidos a tratamiento. Se realizó un análisis de ANOVA que nos muestra con un \* los lotes que presentaron diferencias significativas, utilizando una  $P \leq 0.5$ , al ser comparados con el control farmacológico.

Complementario a lo observado al comparar el control diabético con los diferentes tratamientos (Figura 22), este análisis comparativo contra el control farmacológico (Figura 23) nos permite observar la diferencia significativa entre el control farmacológico y el control diabético, como era de esperarse, y una diferencia aún mayor con el grupo de peces que fue tratado con nanopartículas funcionalizadas a una concentración de 80 µg/mL. Esto nos muestra la clara tendencia de las nanopartículas funcionalizadas a disminuir los niveles de glucosa en sangre incluso más que lo registrado para uno de los medicamentos más utilizados en la actualidad, aun cuando el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* es un conjunto de metabolitos secundarios con actividad biológica, mientras que la glibenclamida que se administra comúnmente para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II es una molécula bioactiva ya aislada.

Se sospecha las sustancias responsables de la actividad hipoglucemiante del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* son flavonoides, ácidos carboxílicos y ácidos cinámicos, ya que se ha reportado que estos compuestos están presentes en *Tillandsia recurvata* y además tienen propiedades antioxidantes, por lo que ayudan a disminuir la formación de ROS (De Queiroga et al., 2004), lo que ayudaría a disminuir el daño por estrés oxidativo, la formación de AGES y las comorbilidades como retinopatía, cataratas o neuropatías.

Otro de los posibles mecanismos de acción que se proponen es influir directamente sobre las células de los islotes de Langerhans del páncreas, estimulando la producción de insulina. Sin embargo, se requieren estudios futuros para determinar el mecanismo de acción específico mediante el cual, el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* ayuda a disminuir los niveles de azúcar en sangre.

#### **13.9.4. Formación de productos finales de glicación avanzada**

Como resultado de la prueba de glicación, se registraron los niveles de emisión de fluorescencia que se muestran a continuación en la Tabla 24 por parte de los diferentes grupos de peces sometidos a tratamiento:

Tabla 24. Intensidad de la señal de emisión de fluorescencia para los diferentes lotes.

Lote	Intensidad de la fluorescencia
<b>B: Control diabético.</b>	3346
<b>C: Control farmacológico.</b>	1678
<b>D: Extracto metanólico <i>Tillandsia recurvata</i> 100 µg/mL.</b>	2560
<b>E: Nanopartículas de plata 40 µg/mL.</b>	2944
<b>F: Nanopartículas de plata funcionalizadas 60 µg/mL.</b>	3188
<b>G: Nanopartículas de plata funcionalizadas 80 µg/mL.</b>	3135
<b>H: Nanopartículas de plata funcionalizadas 100 µg/mL.</b>	2206

Se puede observar en la Tabla 24, que todos los lotes de peces sometidos a tratamiento presentan intensidades de fluorescencia menores al lote que no recibió ningún tratamiento (control diabético) tal y como se esperaba, ya que altas intensidades de la señal de fluorescencia indican la presencia de AGEs en las muestras analizadas. Podemos observar también que la intensidad de la fluorescencia del control diabético es similar a las intensidades emitidas por los grupos de peces sometidos a AgNPs sin funcionalizar y funcionalizadas a 60 y 80 µg/mL, sin embargo al aumentar la concentración a 100 µg/mL la intensidad de la fluorescencia emitida disminuye, lo que significa que esta concentración si funciona para inhibir la formación de AGEs aún más que el extracto por sí solo y también en mayor medida que las nanopartículas sin funcionalizar. Estos resultados nos sugieren que al utilizar AgNPs como vehículo acarreador del extracto metanólico, se potencia la actividad de antiglicación de éste, sin embargo, se deben realizar estudios posteriores para determinar con exactitud la influencia de la presencia de las AgNPs en el potencial de antiglicación del extracto metanólico de *Tillandsia recurvata*.

A continuación, en la Figura 24 se muestra una gráfica comparativa generada a partir de los datos numéricos de la Tabla 24.

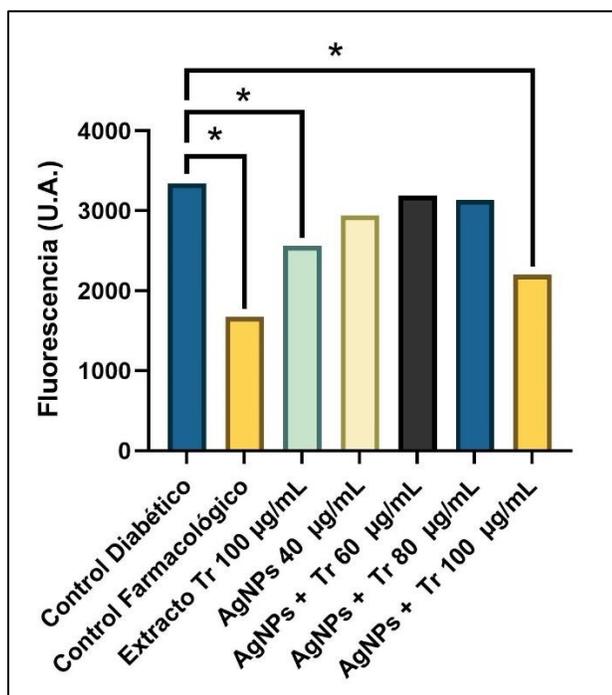


Figura 24. Intensidades de fluorescencia emitidas por cada lote después de ser sometidos a tratamiento. Se realizó un análisis de ANOVA que nos muestra con un \* los grupos de peces que presentaron diferencias significativas, utilizando una  $P \leq 0.5$ , al ser comparados con el control diabético.

Como podemos observar en la Figura 24, al realizar la comparación contra el control diabético aparece una diferencia significativa con el control farmacológico (glibenclamida 5 mg/mL) y con los grupos de peces que fueron tratados con extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* y AgNPs funcionalizadas, ambos a una concentración de 100 µg/mL. Es interesante recalcar que, si bien el extracto metanólico por sí solo presenta la actividad biológica esperada, el lote de peces tratados con nanopartículas funcionalizadas presentó una intensidad de fluorescencia menor a la del lote de peces tratados con este, lo que indica menor formación de AGEs y nos confirma que el utilizar AgNPs como vehículo de transporte del extracto aumenta su potencial de antiglicación. Para complementar esta información, se calculó el porcentaje de inhibición de cada uno de los tratamientos utilizados, los resultados se muestran a continuación.

### 13.9.5. Porcentaje de inhibición.

La intensidad de fluorescencia sin inhibidor utilizada para sustituir en la ecuación (1) fue la de 3346, que es la intensidad medida para el control diabético. Las intensidades de fluorescencia con inhibidor utilizadas fueron las que se reportan en la Tabla 24 y los resultados de la ecuación se muestran a continuación en la Tabla 25.

Tabla 25. Porcentajes de inhibición resultantes al sustituir los datos correspondientes en la ecuación (1).

Lote	Porcentaje de Inhibición
C (control farmacológico)	49.85 %
D (extracto metanólico <i>Tr</i> )	23.49%
E (AgNPs 40 µg/mL)	4.72 %
F (AgNPs + <i>Tr</i> 60 µg/mL)	6.3 %
G (AgNPs + <i>Tr</i> 80 µg/mL)	12.01 %
H (AgNPs + <i>Tr</i> 100 µg/mL)	34.07 %

Se puede observar en la Tabla 25 que el control farmacológico presenta casi un 50% de inhibición, seguido del lote H (AgNPs + *Tr* 100 µg/mL) con un 34.07%, estos resultados confirman que el efecto del tratamiento es dosis dependiente. Además el extracto metanólico por sí solo presenta un porcentaje de inhibición del 23.49%, lo que nos sugiere que el uso de AgNPs funcionalizadas con *Tillandsia recurvata*, arroja mejores resultados que el administrar el extracto solo. A continuación, en la Figura 25 se muestra una gráfica generada a partir de los datos numéricos de la Tabla 25.

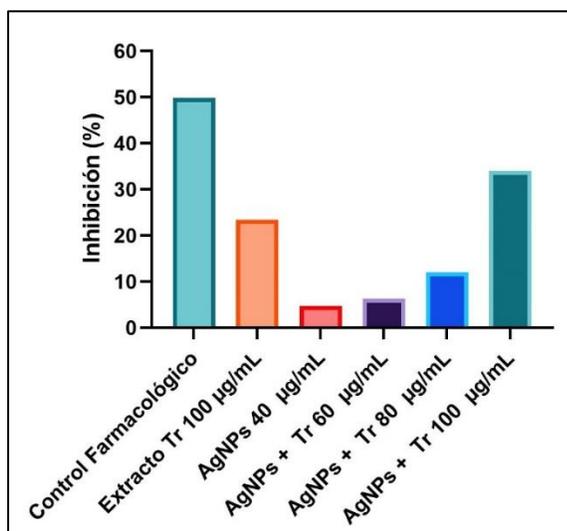


Figura 25. Porcentaje de Inhibición de formación de AGEs de los diferentes tratamientos probados.

En la Figura 25 se puede observar que el porcentaje de inhibición del control farmacológico se encuentra cerca del 50%, mientras que el del resto de los tratamientos se encuentra por debajo del 30%. En este caso la actividad biológica de las nanopartículas funcionalizadas no superó a la del control farmacológico, lo que indica que el potencial de antiglicación del nanomaterial es menor que su potencial hipoglucemiante. El extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* contiene flavonoides y ácidos hidroxicinámicos, moléculas antioxidantes que pueden intervenir en las primeras etapas de la reacción de Maillard, impidiendo la formación de ROS y pausando la reacción en la fase de propagación, antes de que los dicarbonilos oxidantes puedan catalizar nuevas reacciones de glicooxidación proteica, impidiendo así la formación de AGEs (Carvajal Carvajal, 2015). Aun así, se requieren estudios posteriores para identificar los metabolitos secundarios específicos presentes en el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* y su mecanismo de acción al interactuar con el organismo para disminuir la formación de AGEs en condiciones de hiperglucemia.

La glibenclamida actúa directamente sobre canales iónicos de calcio y potasio sensibles a ATP en las células  $\beta$  del páncreas sin afectarlas de

manera negativa, promoviendo la liberación de insulina durante períodos prolongados (Jadna Silva Frederico et al., 2016); también se ha observado que inhibe la producción de glucosa hepática en pacientes con diabetes mellitus tipo II, lo que indica que este fármaco es capaz de actuar directamente sobre el hígado, uniéndose a receptores específicos en los hepatocitos, sin necesidad de depender de la secreción de insulina y se le atribuye, además, actividad similar en tejidos distintos como el músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado. En la Figura 25 podemos observar que su porcentaje de inhibición de formación de AGEs es alto, esto puede ser consecuencia tanto de la presencia del fármaco en sangre, como del efecto de la insulina secretada una vez que el fármaco se unió a su receptor en las células  $\beta$  (Pozza & Luzi, 1997). Es importante notar que, la glibenclamida al ser un medicamento comercial tiene niveles de biodisponibilidad estandarizados, mientras que en el caso de AgNPs funcionalizadas aún se desconoce la concentración del principio activo en plasma una vez que han alcanzado el tejido ocular y cuánto tiempo tardan en hacerlo. Se requieren estudios posteriores para conocer y estandarizar tanto la velocidad de administración, es decir, la velocidad con la que el fármaco administrado de manera oral alcanza la circulación sistémica, si sufre cambios por metabolización o por cambios en el pH del organismo, así como la biodisponibilidad de las nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* en plasma sanguíneo y en tejido ocular de *Danio rerio* diabético.

## 14. Conclusiones

Se obtuvo el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* al que se le realizaron análisis de FTIR-ATR que revelaron la presencia de grupos funcionales pertenecientes a ácidos hidroxicinámicos, ácidos cafeicos y flavonoides.

Se realizó la síntesis química de nanopartículas de plata que fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido, posteriormente se funcionalizaron con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* y se caracterizaron también por espectroscopía electrónica de barrido, espectroscopía UV-vis y posteriormente se les realizó un análisis de cinética de liberación.

Las pruebas *in vivo* demostraron que las AgNPs presentan cierto grado de toxicidad, que disminuye considerablemente una vez que han sido funcionalizadas.

Se concluyó que las nanopartículas de plata funcionalizadas con el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* poseen actividad hipoglucemiante y de antiglicación en modelo de pez cebra diabético. Además, el utilizarlas como sistema de liberación de fármacos demostró disminuir los niveles de glucosa en sangre y la presencia de AGEs en una mayor proporción que el extracto metanólico por sí solo.

Los resultados demuestran que, utilizar AgNPs como vehículo para transportar el extracto metanólico de *Tillandsia recurvata* provoca que disminuyan los niveles de glucosa en sangre, en una proporción mayor que el resto de los tratamientos estudiados, incluyendo el control farmacológico.

Es necesario realizar estudios a futuro para determinar los metabolitos secundarios específicos que se obtienen a partir de la maceración en metanol de *Tillandsia recurvata* y el mecanismo de acción mediante el cual disminuyen los niveles de glucosa en sangre e inhiben la formación de AGEs.

## Referencias.

- (OECD), Organization for the Economic Cooperation and Development (1992). OECD guideline for testing of chemicals. In *Guideline for testing of chemicals* (Issue July, pp. 1–20).
- Álvarez-Guisasola, F., Orozco-Beltrán, D., Cebrián-Cuenca, A. M., Ruiz Quintero, M. A., Angullo Martínez, E., Ávila Lachica, L., Ortega Millán, C., Caride Miana, E., Navarro-Pérez, J., Sagredo Perez, J., Barrot de la Puente, J., & Cos Claramunt, F. X. (2019). Management of hyperglycaemia with non-insulin drugs in adult patients with type 2 diabetes. *Atencion Primaria*, *51*(7), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2019.05.014>
- American Diabetes Association. (2020). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care*, *43*(January), S14–S31. <https://doi.org/10.2337/dc20-S002>
- Aparicio, D., & Marlene Durán. (2016). Más allá de la Diabetes mellitus : glicación de proteínas. *Biociencias*, *11*(1), 105–111. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2875/2289>
- Baruwati, B., Simmons, S. O., Varma, R. S., & Veronesi, B. (2013). “ Green ” Synthesized and Coated Nanosilver Alters the Membrane Permeability of Barrier (Intestinal, Brain Endothelial) Cells and Stimulates Oxidative Stress Pathways in Neurons.
- Buszewski, B., Rafińska, K., Pomastowski, P., Walczak, J., & Rogowska, A. (2016). Novel aspects of silver nanoparticles functionalization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *506*, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.058>
- Campoy, A. H. G., Gutierrez, R. M. P., Manriquez-Alvirde, G., & Ramirez, A. M. (2018). Protection of silver nanoparticles using Eysenhardtia polystachya in peroxide-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage and their antidiabetic properties in zebrafish. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 2601–2612. <https://doi.org/10.2147/IJN.S163714>

- Cardeño, L., & Londoño, M. E. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *Revista Soluciones de Postgrado EIA*, 101(2), 129–140. <http://www.rac.es/ficheros/doc/00547.pdf>
- Carvajal Carvajal, C. (2015). Productos finales de glicación (AGES) y la nefropatía diabética. *Medicina Legal de Costa Rica*, 32(1), 154–160.
- Castellanos-Vargas, I., Cano-Santana, Z., & Hernández-López, B. (2009). Efecto de *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae) sobre el éxito reproductivo de *Fouquieria splendens* Engelm. (Fouquieriaceae). *Ciencia Forestal En México*, 34(105), 197–207.
- Choi, O., & Hu, Z. (2008). *Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria*. 42(12), 4583–4588.
- Chugh, H., Sood, D., Chandra, I., Tomar, V., Dhawan, G., & Chandra, R. (2018). Role of gold and silver nanoparticles in cancer nano-medicine. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup1), 1210–1220. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1449118>
- Cole, J. B., & Florez, J. C. (2020). Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature Reviews Nephrology*, 16(7), 377–390. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>
- Conget, D. I. (2002). Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Revista Espanola de Cardiologia*, 55(5), 528–535. [https://doi.org/10.1016/S0300-8932\(02\)76646-3](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(02)76646-3)
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>
- De Queiroga, M. A., De Andrade, L. M., Florêncio, K. C., Agra, M. D. F., Da Silva, M. S., Barbosa-Filho, J. M., & Leitão Da-Cunha, E. V. (2004). Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia*, 75(3–4), 423–425. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.01.003>
- Diseases, K. (2018). *Sulfonylureas*. *Md*.

- E. Hernández.Pérez, R. Velasco, E. Vega, Y. D. y R. R.-R. (2013). AGEs, diabetes y su relación con la fibrosis hepática. *Revista de Ciencias Clínicas*, 14(1), 30–33.
- Escobedo-De La Peña, J., Buitrón-Granados, L. V., Ramírez-Martínez, J. C., Chavira-Mejía, R., Schargrodsky, H., & Champagne, B. M. (2011). Diabetes en México. Estudio CARMELA. *Cirugia y Cirujanos*, 79(5), 424–431.
- Estrella-Parra, E., Flores-Cruz, M., Blancas-Flores, G., Koch, S. D., & Alarcón-Aguilar, F. J. (2019). The Tillandsia genus: History, uses, chemistry, and biological activity. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 18(3), 239–264.
- Fernando, I., & Zhou, Y. (2019). Chemosphere Impact of pH on the stability , dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48(1–2), 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Fuentes, M., Olmos, P., & Santos, J. L. (2015). Productos finales de glicación avanzada (AGEs) y su importancia en enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición. *Rev. Chil. Endocrinol. Diabetes*, 8(2), 70–77.
- George, S., Lin, S., Ji, Z., Thomas, C. R., Li, L., Mecklenburg, M., Meng, H., Wang, X., Zhang, H., Xia, T., Hohman, J. N., Lin, S., Zink, J. I., & Al, G. E. T. (2012). *Surface Defects on Plate-Shaped Silver Nanoparticles Contribute to Its Hazard Potential in a Fish Gill Cell Line and Zebra fish Embryos*. 5, 3745–3759.
- Gomez-Peralta, F., & Abreu Padín, C. (2014). Do we need new treatments for type 2 diabetes? *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 61(6), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2014.06.002>
- Gugliucci, A. (2000). Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev. Méd. Urug*, 16(1),

58–75.

- Gupta, Y., & Kalra, S. (2015). Screening for diabetes. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 65(1), 105–106. <https://doi.org/10.2337/diacare.16.2.7>
- Hsin, Y., Chen, C., Huang, S., Shih, T., Lai, P., & Ju, P. (2008). *The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells*. 179, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.015>
- Ibáñez Hernández, M. Á. A., Chávez Sandoval, B. E., Balderas López, J. A., García Franco, F., Martínez Jiménez, A., & Galindo Pérez, E. J. (2020). The pH role about synthesis, distribution and potential applications of gold nanoparticles. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 4(1/2), 120. <https://doi.org/10.1504/ijbnn.2020.10029083>
- International Diabetes Federation. (2019). IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium. In *Atlas de la Diabetes de la FID*. [http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014\\_ES.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf)
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339255> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4326978>
- Jadna Silva Frederico, M., Jhonatan Gomes Castro, A., Menegaz, D., De Bernardis Murat, C., Pires Mendes, C., Mascarello, A., Jose Nunes, R., & Regina Mena Barreto Silva, F. (2016). Mechanism of Action of Novel Glibenclamide Derivatives on Potassium and Calcium Channels for Insulin Secretion. *Current Drug Targets*, 18(6), 641–650. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160615084752>
- Jain, K. K. (2020). An Overview of Drug Delivery Systems. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2059). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1)
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of plant secondary metabolites.

*Methods in Molecular Biology*, 864, 341–366. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13)

Kislinger, T., Fu, C., Huber, B., Qu, W., Taguchi, A., Yan, S. Du, Hofmann, M., Yan, S. F., Pischetsrieder, M., Stern, D., & Schmidt, A. M. (1999). N(ε)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 274(44), 31740–31749. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31740>

Lowe, H. (2014). Unearthing the Medicinal Properties of *Tillandsia recurvata* (Ball Moss): A Mini Review. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(9), 1138–1149. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2014/11028>

McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>

Muñiz-Ramirez, A., Garcia-Campoy, A. H., Gutiérrez, R. M. P., Báez, E. V. G., & Flores, J. M. M. (2021). Evaluation of the antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *spondias purpurea* seeds in a diabetic zebrafish model. *Plants*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/plants10071417>

Nangia, S., & Sureshkumar, R. (2012). Effects of nanoparticle charge and shape anisotropy on translocation through cell membranes. *Langmuir*, 28(51), 17666–17671. <https://doi.org/10.1021/la303449d>

Osborne, O. J., Lin, S., Chang, C. H., Ji, Z., Yu, X., Wang, X., Lin, S., Xia, T., & Nel, A. E. (2015). Organ-Specific and Size-Dependent Ag Nanoparticle Toxicity in Gills and Intestines of Adult Zebrafish. *ACS Nano*, 9(10), 9573–9584. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b04583>

Pallavicini, P., Preti, L., Vita, L. De, Dacarro, G., Diaz Fernandez, Y. A., Merli, D., Rossi, S., Taglietti, A., & Vigani, B. (2020). Fast dissolution of silver nanoparticles at physiological pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 563, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.12.081>

- Pozza, G., & Luzi, L. (1997). Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action? *Acta Diabetologica*, *34*, 239–244.
- Rabe-Hesketh, S. (2000). Analysis of Variance II. In *Handbook of Statistical Analyses Using Stata, Fourth Edition* (Vol. 1).  
<https://doi.org/10.1201/9781584888574.ch5>
- Ramirez Rojano, M. (2016). Extracción y caracterización de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus thuringiensis*. Benemérita universidad Autónoma de Puebla . *Facultad de Ciencias Químicas Posgrado En Ciencias Químicas*, 1–81.
- Ravindran, A., Chandran, P., & Khan, S. S. (2013). Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *105*, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.036>
- Recepcional, T., & La, B. (2016). *División académica de ingeniería y arquitectura "Nanopartículas como antitumoral, para entrega localizada en sistema nervioso central"*
- Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J. A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2014). Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, *466–467*, 232–241.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>
- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu, A., Aguilar-Salinas, C. A., Zárate-Rojas, E., Villalpando, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2018). Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. *Salud Publica de Mexico*, *60*(3), 224–232. <https://doi.org/10.21149/8566>
- Sáez, V., Hernández, E., & Sanz Angulo, L. (2002). Sistemas De Liberación Controlada De Medicamentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, *3*(3), 1–20.
- Santizo Rodas, I. M. (2004). *Identificación de familias de metabolitos secundarios en Myrica cerifera*. 1–134.

- Sarras, M. P., Leontovich, A. A., Intine, R. V, Comp, B., Physiol, C., & Toxicol, P. (2015). Use of Zebrafish as a model to investigate the role of epigenetics in propagating the secondary complications observed in Diabetes mellitus ★ The review will discuss the model in regards to: 1) its hyperglycemic phase, 2) its MM phase, 3) biochemical path. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 178, 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc>
- Sikder, M., Lead, J. R., Chandler, G. T., & Baalousha, M. (2018). A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV–Vis. *Science of the Total Environment*, 618, 597–607. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.055>
- Starmans, D. A. J., & Nijhuis, H. H. (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 7(6), 191–197. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10020-0](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10020-0)
- Tezel, G., Timur, S. S., Kuralay, F., Gürsoy, R. N., Ulubayram, K., Öner, L., & Eroğlu, H. (2020). Current status of micro/nanomotors in drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1797052>
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Durán, N., Diez, M. C., Martínez, M., Parada, J., & Seabra, A. B. (2020). Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials*, 390(December 2019), 121974. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121974>
- Wang, Y., Yu, B., Wang, L., Yang, M., Xia, Z., Wei, W., Zhang, F., & Yuan, X. (2017). Pioglitazone ameliorates glomerular NLRP3 inflammasome activation in apolipoprotein E knockout mice with diabetes mellitus. *PLoS ONE*, 12(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181248>
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas controlando forma y tamaño. *Mundo Nano*, 5(1), 70–81. [https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00323\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00323_1.x)
- Zang, L., Maddison, L. A., & Chen, W. (2018). Zebrafish as a model for obesity and

diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(AUG), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091>

Zang, L., Shimada, Y., & Nishimura, N. (2017). Development of a Novel Zebrafish Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01432-w>

Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2015). Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(102), 1–10. <https://doi.org/10.3791/53272>