



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE PRODUCTOS DE ORIGEN
NATURAL SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE EN PERROS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

CLAUDIA KARYNA ALARCÓN COLÍN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. DINORAH VARGAS ESTRADA, FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO, FESC-UNAM

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE, IIB-UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

Marzo 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Romero y a la QBP Arlette Castillo del Departamento de Patología (FMVZ-UNAM) por su paciencia, apoyo técnico y facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo.

A la Dra. Raquel López del Laboratorio de Ensayos Farmacéuticos (FES Cuautitlán-UNAM), la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón (Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ-UNAM), a la Dra. Dinorah Vargas Estrada (Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ-UNAM), al MVZ MC. Alonso Sierra (FMVZ-UNAM), al MVZ. Adrian Moreno (Clínica Veterinaria Meztli) y a la MVZ. Linaloe Manzano Pech, por su apoyo técnico y facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo, así como por su amistad, consejos, guía y enseñanzas a lo largo de éste camino.

A la Sra. Obdulia González, el Sr. Manuel Salcedo y la Sra. Tomasa Rodríguez del Refugio “Salvando Peludos A.C.” por su apoyo técnico y facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo, así como por su confianza para permitirme trabajar con los perritos que con tanto esfuerzo mantienen fuera de las calles para que encuentren después un nuevo hogar.

Al proyecto PAPIIT IT202317y la beca de CONACYT 42159, por el financiamiento otorgado para la realización de una parte de esta investigación.

Agradezco ahora y sin duda alguna a mis padres, quienes con esa enorme dedicación, esfuerzo y sacrificio que ponen en todos los sentidos, son siempre el ejemplo más grande que tengo para nunca abandonar lo que me proponga. Agradezco infinitamente su gran amor y apoyo durante esta nueva etapa de mi formación profesional porque sin ustedes no hubiera sido posible aspirar a ella. Saben que todo el amor, todas las palabras ó todo el tiempo del mundo no bastaran para terminar de pagarles y agradecerles lo que han hecho y siguen haciendo por mi. Gracias de nuevo. Los amo con todo mi corazón.

Agradezco de igual manera a mi hermano por tanto que hemos compartido toda la vida, porque a pesar de los años sigue vigente esa conexión única que tenemos entre nosotros y que nos identifica como los hermanos que somos y seremos siempre.

Agradezco a mis familiares, por siempre creer en mi, por quererme, alentarme a seguir adelante y simplemente por ser parte de mi familia. Agradezco de manera especial a mi abuelito José porque aunque fue poco tiempo el que tuve el gusto de contar con su presencia siempre me dijo que yo podría llegar muy lejos si me lo proponía, y también a mi abuelito Rafael a quien lamentablemente no tuve el gusto de mostrarle el fruto de estos años dedicados a la continuación de mis estudios, pero que sé que donde quiera que se encuentre, está orgulloso de mi.

A la Dra. Dinorah Vargas Estrada, por ser mi asesora de tesis así como por su paciencia, amistad y todo el apoyo y atención que me ha brindado para la realización de este trabajo.

A las doctoras Raquel López Arellano y María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, por formar parte de mi comité tutorial y por todo el apoyo y atención que me ha brindado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón, quien estuvo siempre dispuesta a ayudarme, aconsejarme y hasta regañarme cuando fue necesario, para poder seguir adelante con mi proyecto.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos y el Departamento de Farmacología de la FMVZ-UNAM, por abrirme las puertas para poder llevar a cabo la realización de mi doctorado.

A mis queridos amigos: Ale, Lulú, Daniela (un millón de gracias por todo, en especial por no dejarme flaquear en los momentos más difíciles y por su sincera amistad todos estos años); a Loe, Adrian, Javier, Deny, Manuel (mil gracias por tantas alegrías, por tantas pláticas enriquecedoras de los más diversos temas y simplemente por permitirme disfrutar de su amistad); a mis amigos de la carrera, a mis hermanos del DNAB y a mis amigos y colegas de Farma, por compartir conmigo tanto buenos como malos momentos y por continuar ahí presentes a pesar de la distancia.

A los doctores: Sara del Carmen Caballero Chacón, María Eugenia Gonsebatt, Roberto Díaz Torres y José Juan Escobar Juárez, por aceptar formar parte de mi jurado y por todos sus consejos, que ayudaron a dar forma al trabajo que hoy tengo el placer de presentar.

A todas las personas que por falta de memoria no menciono individualmente pero que con sus conocimientos, consejos, amistad y apoyo sin duda han influido positivamente en mi a lo largo del tiempo y me han ayudado para que pudiera llegar a este momento de mi vida.

Finalmente agradezco a mis pequeños Kovu y Tweety por su compañía y cariño incondicional; y a todos los animalitos que me permitieron trabajar con ellos en pro de mi incesante formación profesional.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes con su amor, sacrificio e infinitos consejos siempre me han apoyado en todas mis decisiones a lo largo de mi vida. Los amo y nunca podré dejar de agradecerles lo que siempre han hecho y siguen haciendo por mi.

A mi hermano, por su apoyo y por siempre estar ahí ya sea para reír, discutir o llorar, como familia unida que somos.

Al resto de mi familia, por nunca dudar de mis capacidades y darme siempre palabras de aliento y una sonrisa.

Al MVZ. Fernando Abundiz por su maravillosa amistad, su paciencia y por ser mi guía y mentor al transmitirme la sabiduría profesional que sólo se adquiere en la vida práctica de esta maravillosa carrera.

Al MVZ. Adrián Moreno y a la MVZ. Linaloe Manzano, por su sincera amistad, por todo su apoyo y por todos los momentos inolvidables que hemos compartido y que hicieron mucho más ameno el proceso de trabajo que implica éste reto académico que hoy concluye.

A mis hijos de otras especies: Tweety (mi lindo canario con alma de perro). A Puchi, Chiquilín, Bluck y mis tortugas, que en paz descansen... y desde luego a Kovu (bebé, lamentablemente te fuiste no mucho después de que comenzaba con ésta nueva etapa de mi vida académica, pero por lo mismo dejaste huella en ella en más de un sentido, por eso y mucho, mucho más siempre estarás en mi corazón, gracias por tanto y tanto en verdad, nunca te olvidaré).

A todos mis queridos amigos por brindarme su amistad y compartir conmigo tantos momentos de risas, tristezas, enojos y reflexiones.

A todos aquellos que individualmente no menciono pero que siempre han creído en mí y me han apoyado, aconsejado o simplemente me han regalado una sonrisa.

A todos los animales, porque si ellos no existieran no hubiera decidido adentrarme más en el maravilloso y amplio mundo que es la Medicina Veterinaria.

ÍNDICE

I. Resumen.....	7
II. Abstract.....	9
III- Introducción.....	11
IV. Antecedentes.....	38
V. Justificación.....	51
VI. Hipótesis.....	53
VII. Objetivos.....	53
VIII. Metodología.....	55
IX. Fase Experimental.....	58
X. Discusión y resultados.....	69
XI. Conclusiones.....	100
XII. Anexos.....	103
XIII. Cuadro de literales.....	110
XIV. Referencias bibliográficas.....	115

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos productos[®] de origen natural con propiedades hipoglucemiantes (*Aloe barbadensis*[®] y extracto de propóleo[®]), sobre las concentraciones de glucosa en sangre en perros, con el propósito de verificar si pueden considerarse como parte de un tratamiento alternativo viable, sólo ó en conjunto, para el control de los niveles de glucosa en sangre en ésta especie.

Previo al estudio principal, se comprobó la eficacia de la prueba rápida de medición de glucosa en sangre con tiras reactivas y glucómetro como un método válido y seguro para el diagnóstico y monitoreo de los niveles de glucosa en sangre de los pacientes que acudan a la clínica de pequeñas especies.

El presente estudio se dividió en tres etapas. Para cada etapa se utilizaron 8 perros, cuyos propietarios firmaron una carta de consentimiento para su inclusión en el mismo. Para la etapa 1 los perros considerados para el estudio cumplieron con las siguientes características: clínicamente sanos, con edades entre 2-8 años, de tamaño mediano, con una condición corporal (CC) considerada ideal (3/5), de acuerdo a la escala de Condición Corporal de Cinco Puntos. Para la etapa 2 los perros considerados para el estudio cumplieron con las siguientes características: clínicamente sanos, con edades entre 2-8 años, de tamaño mediano, con una CC considerada en sobrepeso (4/5), de acuerdo a la escala de Condición Corporal de Cinco Puntos. Para la etapa 3 los perros considerados para el estudio cumplieron con las siguientes características: clínicamente sanos, con edades entre 2-8 años, de tamaño mediano, con una CC considerada en obesidad (5/5), de acuerdo a la escala de Condición Corporal de Cinco Puntos. Para cada etapa del estudio se utilizó el modelo de medias repetidas para pruebas cruzadas (análisis estadístico para un diseño

experimental completamente al azar de 1 factor y 3 niveles, incluyendo el control). El periodo de lavado entre cada tratamiento administrado fue de una semana.

De los dos tratamientos realizados, el *Aloe barbadensis*[®] es el que mostró un mejor efecto hipoglucemiante a corto plazo en el caso de las etapas 2 (perros clínicamente sanos, de entre 2-8 años, con una CC 4/5) y 3 (perros clínicamente sanos, de entre 2-8 años, con una CC 5/5) del estudio, lo que resultó compatible con lo descrito en la literatura. En el caso del extracto de propóleo[®] no se observó efecto clínico estadísticamente significativo de las concentraciones de glucosa en sangre a corto plazo para ninguna de las tres etapas del estudio, lo que no necesariamente indica que no exista tal efecto sobre los mismos, pero de acuerdo a los estudios previos consultados en la literatura, se recomienda aumentar la cantidad de individuos para la muestra así como el tiempo de tratamiento (mínimo de un mes) para observar algún efecto hipoglucemiante del extracto de propóleo.

Como parte de los resultados obtenidos y a partir de los valores de los analitos de las pruebas de laboratorio realizadas (Hemograma, Bioquímica y Hemoglobina glicosilada), se comprobó que no existe efecto de toxicidad aguda con ninguno de los dos tratamientos administrados.

Derivado de los resultados obtenidos del estudio principal se comprobó la eficacia de la prueba rápida de medición de glucosa en sangre con tiras reactivas y glucómetro como un método válido y seguro para el diagnóstico y monitoreo de los niveles de glucosa en sangre de los perros en la clínica veterinaria.

Palabras clave: *aloe barbadensis*, diabetes, extracto de propóleo, glucosa, sangre, perros.

ABSTRACT

The target of this study was to evaluate the effect of two different natural origin products with hypoglycemic properties (Aloe barbadensis[®] and propolis extract[®]), in dogs' blood-glucose concentrations, with the purpose of verifying if they can be considered as a part of a viable alternative treatment, alone or altogether, to control the blood-glucose levels in this species.

Prior to the main study, the effectiveness of the rapid test of blood glucose measurement with test strips and glucometer was verified as a valid and safe method for the diagnosis and monitoring of blood glucose levels of patients who could come to the clinic of small species.

The present study was divided on three stages. For each stage were used 8 dogs, whose owners signed a Consent Letter for their inclusion in it. For stage 1 the dogs considered for the study had the following characteristics: clinically healthy, with ages between 2-8 years, medium size, with a body condition (CC) considered ideal (3/5), according to the Five Point Body Condition Scale. For stage 2 the dogs considered for the study had the following characteristics: clinically healthy, with ages between 2-8 years, medium size, with a CC considered overweight (4/5), according to the Condition scale Five Point Body. For stage 3 the dogs considered for the study had the following characteristics: clinically healthy, with ages between 2-8 years, medium size, with a CC considered in obesity (5/5), according to the Condition scale Five Point Body. The repeated means model for cross-tests (statistical analysis for a completely randomized design of 1 factor and 3 levels, including control) was used for each stage of the study. The washout period was about one week between each treatment administered.

Of the two administered treatments, *Aloe barbadensis*[®] was the one that showed a better hypoglycaemic effect on short term in the case of stages 2 (clinically healthy dogs, between 2-8 years, with a 4/5 CC) and 3 (clinically healthy dogs, between 2-8 years, with a 5/5 CC) of the study, which was compatible with what is described in the literature. In the case of the propolis extract[®] there were no statistically significant clinical effects in blood-glucose concentrations on short term, for any of the three stages of the study, which does not necessarily indicate that there is no such effect on them, but according to the previous studies consulted in the literature, is recommended to increase the number of individuals for the sample as well as the treatment time (one month minimum) to observe some hypoglycemic effect of the propolis extract.

As part of the obtained results and from the analytes' values of the completed laboratory tests (Hemogram, Biochemistry and glycosylated hemoglobin), it was found that there is no acute toxicity effect with either of the two treatments administered.

Derived from the obtained results from the main study, the effectiveness of the rapid test of blood glucose measurement with test strips and glucometer was verified as a valid and safe method for the diagnosis and monitoring of blood-glucose levels of dogs in the veterinary clinic.

Key words: *aloe barbadensis*, diabetes, propolis extract, glucose, blood, dogs.

EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE EN PERROS

III. INTRODUCCIÓN:

Todo individuo requiere de energía tanto para mantener la homeostasis como para poder realizar sus actividades normales. Dicha energía puede provenir de tres fuentes de macronutrientes: carbohidratos, proteínas y lípidos, los cuales son obtenidos a partir de la dieta consumida, dependiendo de la especie y estado fisiológico del animal. De estos macronutrientes, la principal fuente de obtención de energía para el organismo es la glucosa, obtenida a partir de los carbohidratos.¹⁻³

En el organismo sano se requiere que los niveles de la glucosa en sangre permanezcan dentro de un rango fisiológico. En el caso de los perros, durante el ayuno la concentración de glucosa en sangre es de 75-120mg/dL, pero esta puede verse elevada posterior a la ingesta de alimento, con valores de hasta 180-200mg/dL. Para regular esta situación, después de la digestión del alimento, existen rutas moduladas por hormonas que intervienen en el transporte de la glucosa desde el torrente sanguíneo hasta el interior de las células, donde llevarán a cabo su función en el organismo.¹⁻⁶

En los perros, cuando las vías metabólicas donde actúa o se relaciona la glucosa se ven alteradas por diferentes condiciones como el sobrepeso o la obesidad, pueden ocasionar una disfunción celular, lo que lleva al organismo a utilizar mecanismos de compensación para mantener la homeostasis. Cuando a pesar de dicho esfuerzo el individuo no es capaz de

regresar a los parámetros fisiológicos normales, es entonces cuando pueden presentarse en enfermedades como la diabetes mellitus (DM) de tipo insulino dependiente.¹⁻⁶

La DM insulino dependiente es una enfermedad multifactorial, de curso crónico, en la que el Médico Veterinario puede hacer uso de varias herramientas (físicas, químicas y/o farmacológicas) para llevar a cabo su diagnóstico y tratamiento, con el fin de proporcionar al paciente una mejor calidad de vida durante el resto de su vida, pues la esperanza de vida en los perros podría llegar a ser de 10-16 años en promedio (si el propietario se apegó al cumplimiento de la prescripción de forma responsable en tiempo y forma), a diferencia de la especie humana, que aún padeciendo la enfermedad puede tener una esperanza de vida de hasta 75-80 años en promedio ¹⁻⁶

A continuación, se presenta una revisión sobre el metabolismo, transporte y función de la glucosa, así como su relación con enfermedades como la obesidad y diabetes en perros.

A. METABOLISMO DE LA GLUCOSA:

Los carbohidratos (polisacáridos, disacáridos, monosacáridos) son macronutrientes que proporcionan más de la mitad de la energía necesaria para llevar a cabo el metabolismo, el cual puede definirse como la suma de todas las reacciones anabólicas y catabólicas en las que los nutrientes proveen la materia prima y que se llevan a cabo para mantener las funciones fisiológicas (homeóstasis) de un individuo, incluyendo reparación de tejidos, secreción de sustancias, función del sistema inmune, crecimiento, gestación, reproducción y movimiento. ⁷⁻⁹

Los nutrientes (en éste caso los carbohidratos) deben pasar por varios procesos como son masticación, digestión y absorción en el intestino, con el propósito de ingresar al torrente sanguíneo y finalmente a los tejidos, para su aprovechamiento en el organismo.⁸⁻¹¹

De los carbohidratos que se obtienen a través de la dieta del individuo, la glucosa (monosacárido clasificado como una hexosa al estar formada por seis átomos de carbono) juega un papel relevante, ya que su función principal es la de proporcionar energía al organismo en forma de ATP, al catabolizarse como piruvato (proceso aeróbico) o lactato (proceso anaeróbico) durante la glucólisis.⁹⁻¹²

La tasa de digestión y absorción de la glucosa puede variar entre individuos de la misma especie que lleven regímenes alimenticios similares. En animales sanos, al ingerir una comida rica en carbohidratos, aunque la concentración de glucosa en sangre puede elevarse considerablemente por encima de la concentración en ayunas, bajo condiciones fisiológicas normales, tal concentración regresará a niveles basales en un periodo de tiempo relativamente corto.⁸⁻¹²

B. TRANSPORTE DE LA GLUCOSA A LAS CÉLULAS:

Durante la ingesta, en las especies no rumiantes como el perro, el almidón y el glucógeno de la dieta comienzan a hidrolizarse gracias a las enzimas amilasa y α -glucosidasa de la saliva, que rompen parte de los enlaces β 1-4 y α 1-6 de los polisacáridos, respectivamente. Posteriormente, ya formado el bolo alimenticio, éste pasa hasta el estómago y al intestino delgado.¹³ Una vez en el intestino delgado, los enlaces que no fueron rotos por las enzimas salivales, terminan de ser escindidos gracias a las α -glucosidasas intestinales cuya localización se encuentra en el borde del cepillo de los enterocitos (Figura 1). De esta

manera se libera finalmente la glucosa y puede ser transportada hasta el torrente sanguíneo gracias al cotransportador de sodio-glucosa GLUT-1, también conocido como SGLT-1 por su nombre en inglés (Sodium-Glucose Linked Transporter 1), cuya función es sostenida por la bomba de Sodio-Potasio localizada en el borde lateral de la célula. En este punto, la glucosa funge como transportador de agua, al llevar consigo una molécula de H₂O durante su ingreso a través de la membrana y hasta el torrente sanguíneo.^{7, 12-16}

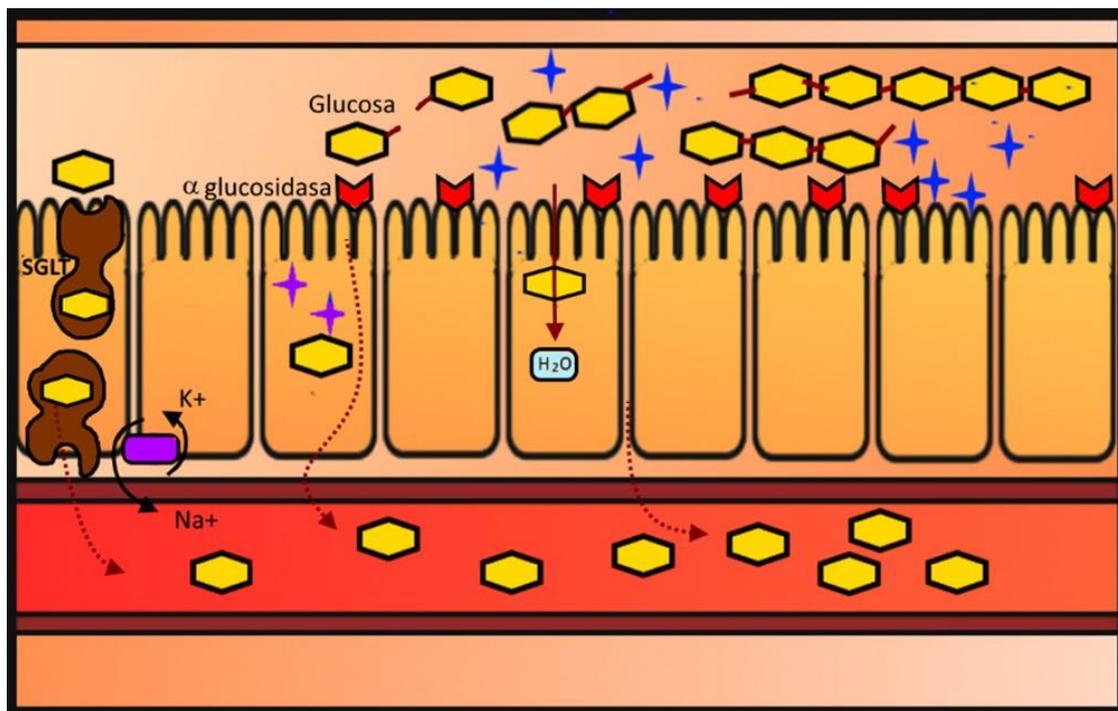


Figura 1. Liberación y paso de glucosa a través del intestino hasta el torrente sanguíneo.

Aunque es posible encontrar trazas de fructosa y galactosa, la glucosa es la fuente de energía que predomina en el torrente sanguíneo.¹³⁻¹⁸

La glucosa en sangre es transportada por la vena porta primeramente hasta el hígado, pero para su ingreso a éste y la mayoría de los órganos (con excepción de los eritrocitos y el

cerebro, los cuales son directamente dependientes de glucosa como fuente de energía) requieren de una señal que proviene de la insulina. Sin embargo, en caso de ayuno, tejidos como el músculo esquelético o el cerebro, son capaces de obtener ATP a partir de la oxidación de cuerpos cetónicos y ácidos grasos para ser menos dependientes de la glucosa en sangre.¹³⁻¹⁸

Para activar la señalización de la insulina, ésta primero debe ser producida y liberada por las células β del páncreas (Figura 2). La glucosa es quien desencadena en primera instancia esta producción con el propósito de regular la hiperglucemia pospandrial.^{15, 19}

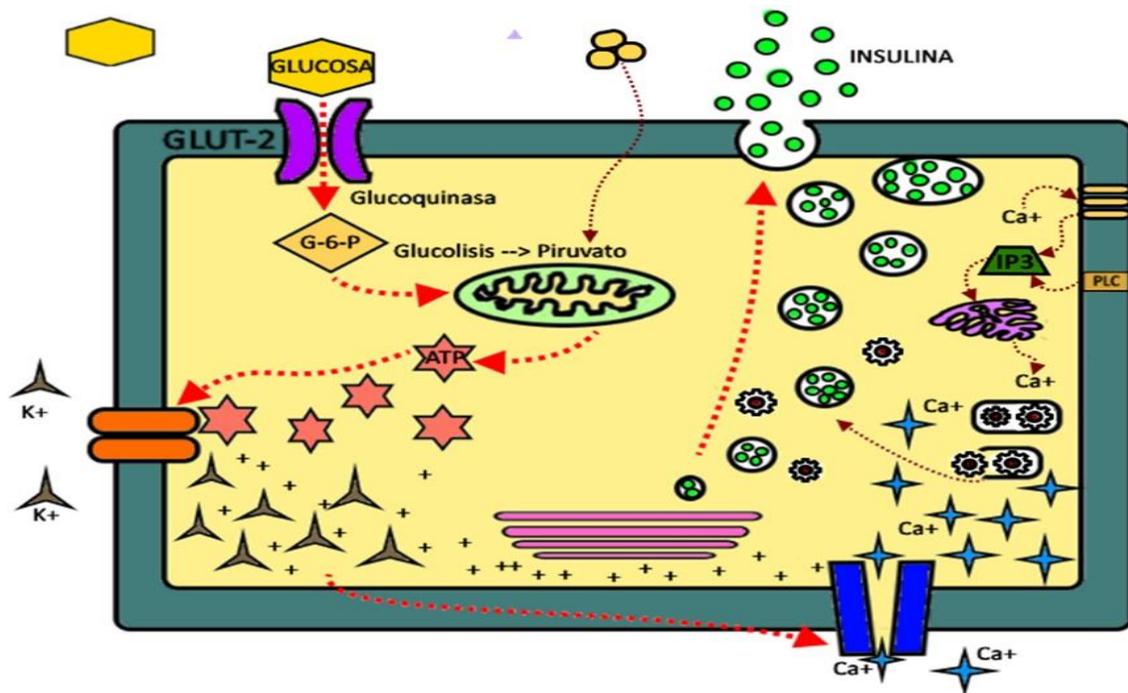


Figura 2. Producción y liberación de insulina, estimulada por hiperglucemia pospandrial: La glucosa se une al receptor Glut-2 (considerado un sensor de homeostasis) y gracias a la glucoquinasa (GK) es transformada a glucosa-6-fosfato (G-6-P), que entrará a la ruta de la glucólisis, generando piruvato que a su vez entrará a la mitocondria para el ciclo de Krebs, generando ATP. El ATP producido estimulará el cierre de los canales de Potasio dependientes de ATP (canales K⁺ATP), provocando el acumulo de Potasio intracelular (K⁺), lo

que despolariza la membrana, estimulando entonces la apertura de canales de Calcio dependientes de voltaje que dejarán libre el paso de Calcio (Ca⁺) al interior de la célula. El Calcio permitirá la liberación y transporte de las vesículas contenedoras de gránulos de insulina desde el Aparato de Golgi hasta la superficie de la membrana, donde por exocitosis, será liberada finalmente la insulina hacia el torrente sanguíneo.^{15, 19}

Ya liberada la insulina, llegará hasta su receptor en la membrana y activará por un lado, la vía de las MAP cinasas, también conocida como vía MAP/ERK ó MAPK por sus siglas en inglés (Mitogen-Activated Protein Kinases), lo que permitirá la transducción de genes para proteínas muy importantes para el metabolismo celular (incluyendo la Akt/PKB); por otro lado activará la vía PI3K (Fosfatidilinositol-3 quinasa o Phosphatidylinositol 3-kinase en inglés), que a su vez permitirá la activación de la enzima Akt/PKB (Akt/Protein quinasa B) cuyo papel relevante en los tejidos varía^{7-11,19} pero uno de esos papeles implica la fosforilación de residuos de Treonina (Thr) y Serina (Ser), lo que permitirá la degradación de endosomas que contienen a los transportadores de glucosa GLUT-4, para su liberación y expresión en la membrana celular, permitiendo así el ingreso de la glucosa a la célula¹⁹ (Figuras 3 y 4)

Al momento que la glucosa pasa al interior de la célula, la enzima Glucoquinasa la transforma rápidamente en glucosa-6-fosfato (G-6-P) para mantenerla dentro del citosol y así llevar a cabo reacciones metabólicas como:^{15, 16, 19}

- Catabolismo a piruvato dentro del ciclo del ácido cítrico para dar energía a la célula
- Conversión en glucógeno intracelular para su almacenaje como reserva de energía

- Ingresar al ciclo de las pentosas para llevar a cabo la biosíntesis de glucolípidos, ácidos nucleicos o lactosa
- Conversión en triacilglicerolos como reserva de energía.

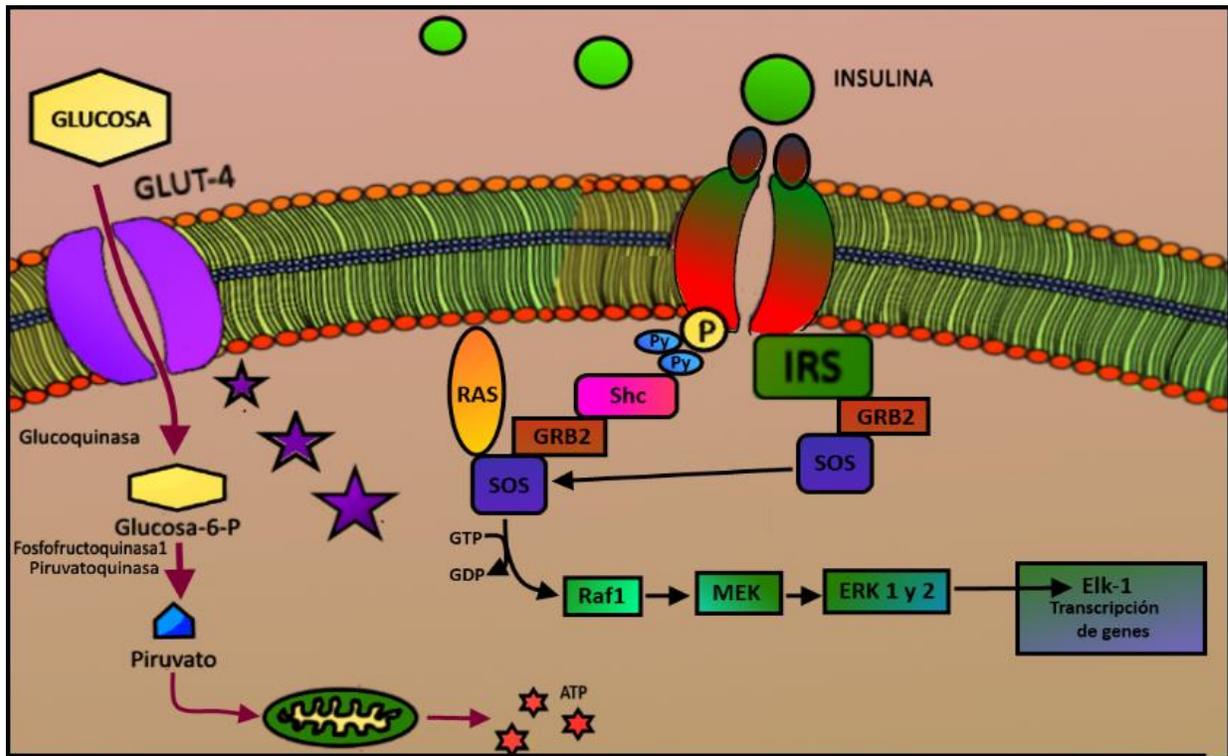


Figura 3: La vía de la MAP cinasa tiene como propósito activar la transcripción de genes para las proteínas de regulación de expresión genética de tejidos sensibles a insulina (como la Atk/PBK). Sin embargo, no regula el transporte de glucosa. Durante ésta vía la insulina se une al receptor IRS (Insulin Receptor Substrate), promoviendo la autofosforilación de IRS y de los residuos de tirosina (Tyr), para poder asociarse a la proteína Shc, la que a su vez se une al complejo de proteínas GRB2/SOS. Posteriormente el complejo activa a la proteína RAS a partir de la fosforilación por GTP, permitiendo que RAS active a las proteínas de transcripción en el siguiente orden: RAF1, luego éste a MEK, éste a su vez a a ERK 1 y 2 y finalmente éstos a Elk-1 ¹⁹

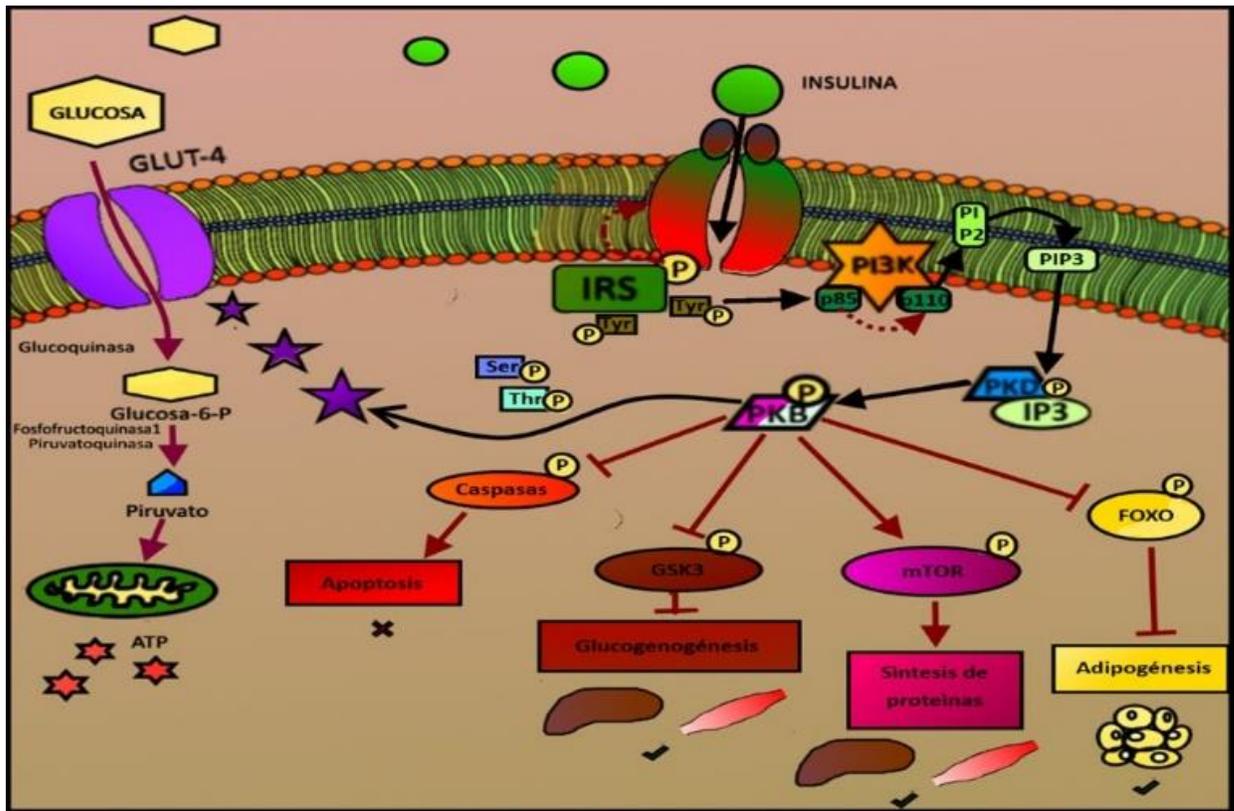


Figura 4: Al fosforilar la enzima Akt/PKB, ésta permite entre otras funciones: inhibir a las caspasas (que promueven la apoptosis celular); inhibir la Glucoquinasa 3 (GSK3) que en estado activo inhibe la glucogénesis y por lo tanto, el acúmulo de glucosa en forma de glucógeno en hígado y músculo esquelético; promueve a la diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR por sus siglas en inglés (mammalian Target of Rapamycin), permitiendo la síntesis de proteínas en hígado y tejido muscular esquelético; inhibe a la proteína FOXO, que en condición activa inhibe la lipogénesis; fosforila residuos de Treonina y Serina, lo que permite la degradación de endosomas que contienen a los transportadores de glucosa GLUT-4, para su liberación y expresión en la membrana celular, permitiendo así el ingreso de la glucosa a la célula¹⁹

C. EFECTOS DE LA INSULINA EN EL HÍGADO, TEJIDO ADIPOSO Y MÚSCULO:

La insulina tiene muchos efectos sobre los diferentes tejidos, pero entre los más importantes se encuentran los que ejerce sobre órganos estrechamente relacionados con el metabolismo de la glucosa, como son: hígado, tejido adiposo y músculo esquelético (Figuras 5, 6 y 7).

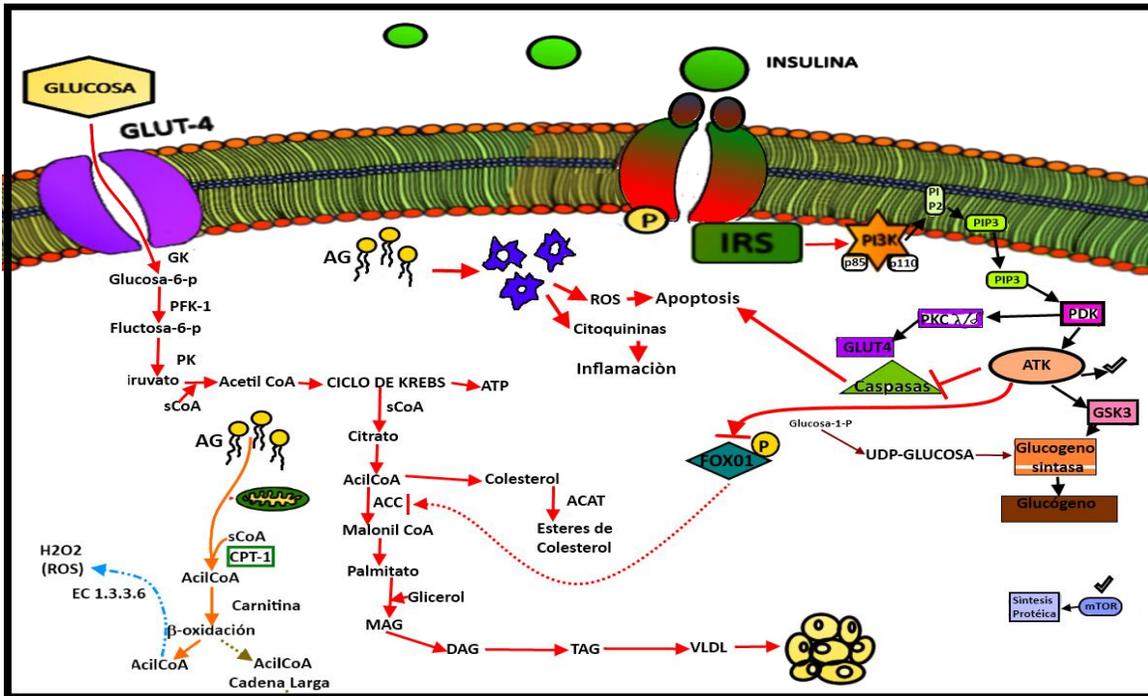


Figura 5. EFECTOS DE LA INSULINA EN HÍGADO: Una vez que la insulina se une a su receptor de membrana y activa a la vía PI3K, ésta permitirá la activación de la enzima Akt/PKB (Akt/Protein quinasa B)⁹. Por un lado, promueve la fosforilación de residuos de Treonina y Serina para la degradación de endosomas que contienen a los transportadores de glucosa GLUT-4, para su posterior liberación y expresión en la membrana celular, permitiendo así el ingreso de la glucosa a la célula hepática⁹. Por otro lado, otras funciones importantes en este órgano son: inhibir la Glucoquinasa 3 (GSK3) la cual en estado activo inhibiría la glucógenogénesis y por lo tanto, el acúmulo de glucosa en forma de glucógeno; promover a la diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR, permitiendo la síntesis de proteínas en hígado; inhibe a la proteína FOX 0, que en condición activa inhibiría la lipogénesis. Asimismo evita la acción de las caspasas, que promueven la apoptosis celular.^{15, 16, 19}

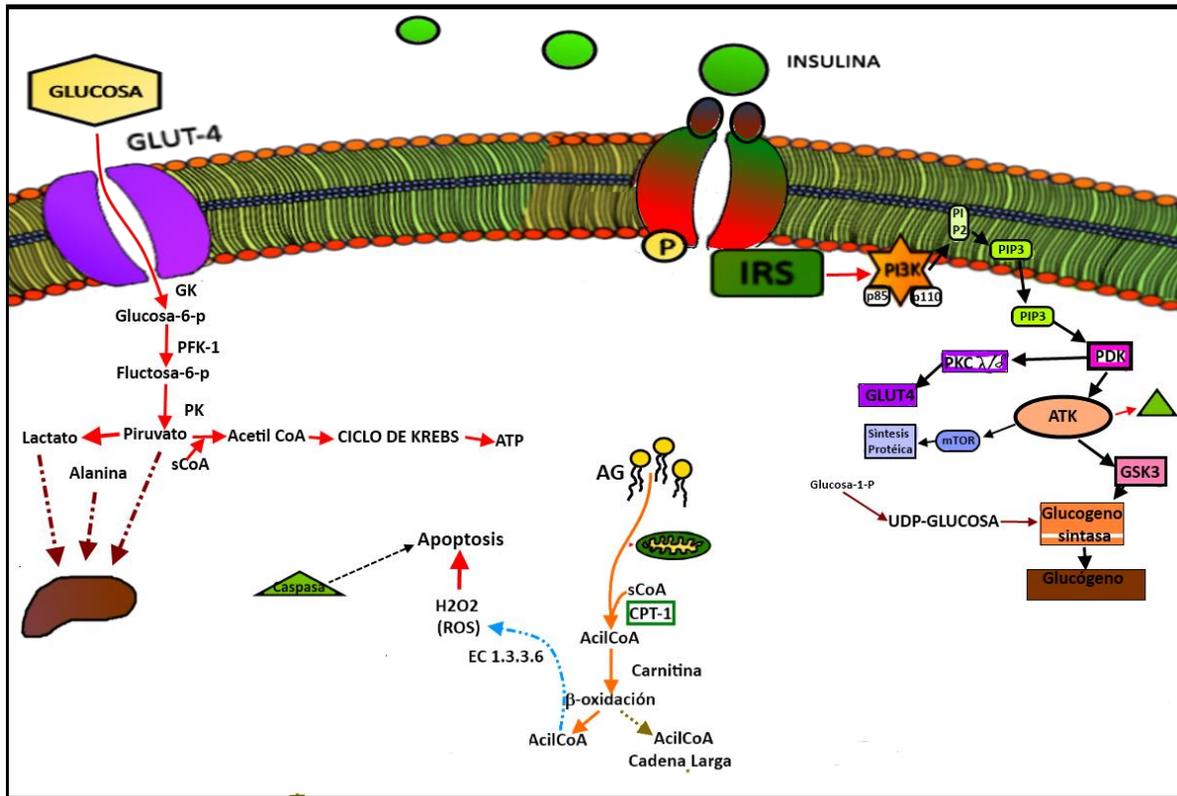


Figura 6. EFECTOS DE LA INSULINA EN TEJIDO ADIPOSITO: Una vez que la insulina se une a su receptor de membrana y activa a la vía PI3K, que permitirá la activación de la enzima Akt/PKB (Akt/Protein quinasa B)⁹, por un lado promueve la fosforilación de residuos de Treonina y Serina para la degradación de endosomas que contienen a los transportadores de glucosa GLUT-4, para su posterior liberación y expresión en la membrana celular, permitiendo así el ingreso de la glucosa a la célula adiposa⁹. Por otro lado, otras funciones en éste órgano son: promover a la diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR, principalmente para la regulación de PPAR γ , factor de transcripción importante en la lipogénesis; inhibe a la proteína FOX O, permitiendo que la SREBP-1c (Sterol regulatory element-binding protein, una proteína anclada a retículo endoplásmico) codifique proteínas como la Acetil CoA carboxilasa (ACC), la sintetasa de ácidos grasos (FAS) y la acil CoA deshidrogenasa y por lo tanto, la lipogénesis. Asimismo evita la acción de las caspasas, que promueven la apoptosis celular.^{15, 16, 19}

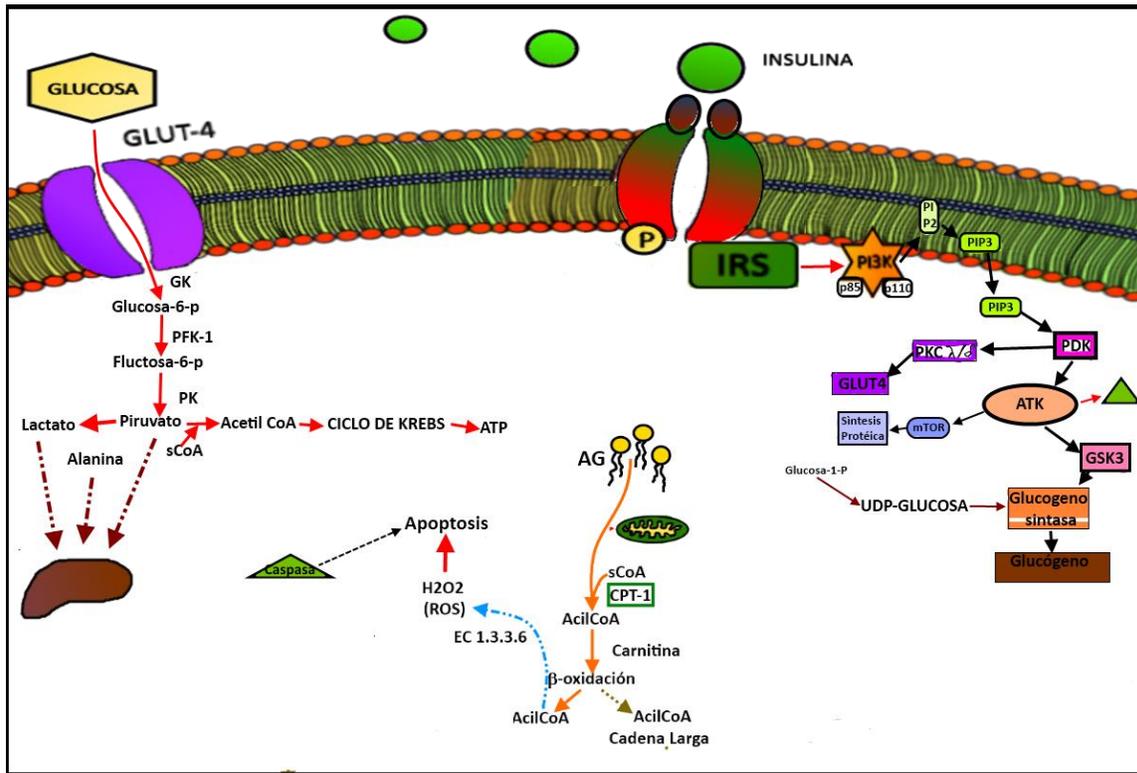


Figura 7. EFECTOS DE LA INSULINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO: Cuando la insulina se une a su receptor de membrana y activa a la vía de la PI3K, ésta permitirá la activación de la enzima Akt/PKB (Akt/Protein quinasa B)⁹. Por un lado promueve la fosforilación de residuos de Treonina y Serina para la degradación de endosomas que contienen a los transportadores de glucosa GLUT-4, para su posterior liberación y expresión en la membrana celular, permitiendo así el ingreso de la glucosa a la célula adiposa ⁹. Por otro lado, otras funciones en éste órgano son: promover a la diana de rapamicina en células de mamífero o mTOR, para la síntesis de proteínas para la formación muscular y evitar la acción de las caspasas, que promueven la apoptosis celular.^{15, 16, 19}

D. RESISTENCIA A LA INSULINA, GLUCOTOXICIDAD Y LIPOTOXICIDAD:

i. RESISTENCIA A LA INSULINA. También se le conoce como insulinoresistencia. Es una alteración genética o adquirida de la respuesta tisular a la acción de la insulina. En términos fisiológicos se refiere a una inadecuada captación de la glucosa dependiente de insulina por parte de los tejidos, en especial del hígado, músculo y tejido adiposo.²⁰⁻²²

La resistencia a la insulina se ve asociada generalmente a una hiperinsulinemia. De acuerdo a la literatura, se ha discutido en diversos estudios, acerca de cuál es el evento que se desencadena primero, pero sin llegar a una conclusión definida, por lo que se ha propuesto que ambos se llevan a cabo en tiempo similar mediante un mecanismo compensatorio del organismo para tratar de mantener la homeostasis de glucosa (normoglucemia), especialmente como protección para el cerebro. Sin embargo, esta respuesta adaptativa se asocia en perros con el desarrollo de la diabetes insulinoindependiente.^{21,22}

De acuerdo a la literatura²⁰⁻²², se postulan tres mecanismos para explicar la hiperglucemia y la resistencia a la insulina:

1. Disminución de la síntesis y actividad de Glut-4 en el músculo: Ya que la glucosa requiere de un transportador proteico, pero al presentarse la hiperglucemia, la célula reacciona formando un menor número de transportadores o reduciendo su actividad.
2. Aumento de la vía de la glucosamina: De acuerdo a la literatura²⁰⁻²², durante un estudio en el cual se administró glucosamina a ratas, ésta producía resistencia a la

insulina y déficit en su secreción, debido a la disminución de Glut-4 en el músculo y de Glut-2 en las células β . La explicación dada es que del 2-3% de la glucosa se degrada para formar glucosamina pero al haber hiperglucemia la vía está sobrestimulada, lo que puede resultar en toxicidad.

3. Glucosilación de transportadores: Niveles altos y constantes de glucosa originan que se una a los aminos terminales de las proteínas (glucosilación), cambiando así la estructura y función de las moléculas, tal es el caso de los transportadores de glucosa y como consecuencia ocasionan una menor captación de glucosa en los tejidos periféricos.

Además de estos posibles mecanismos, varios estudios proponen que al existir un exceso de glucosa en sangre debido a una dieta alta en energía (proveniente de carbohidratos y ácidos grasos), puede provocar una mala función en la célula pancreática, debido a que tanto la glucosa como los ácidos grasos en exceso se vuelven tóxicos. De esto se derivan los términos de glucotoxicidad y lipotoxicidad, para definir el mecanismo por el cual el nutriente correspondiente altera la función de la célula β .²⁰⁻²⁴

- ii. GLUCOTOXICIDAD.** La glucosa es la principal fuente de energía celular, pero en la célula β no solamente aporta energía, sino que sirve como sensor dentro del complejo mecanismo de liberación de la insulina por parte de la célula, ajustando así la cantidad de hormona secretada de acuerdo a la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo. Esta relación puede ser tanto positiva como negativa,

dependiendo del tiempo al que la célula β sea expuesta a la hiperglucemia, ya sea de forma aguda (fisiológico) o crónica (patológico)²¹⁻²⁶.

Para explicar la glucotoxicidad, se han propuesto cinco mecanismos^{21-22,24-26}

1. La hiperglucemia por regulación negativa produciría una disminución de transportadores de glucosa (Glut-2) en las células β .
2. Una menor actividad de la fosfolipasa C (PLC), ya que es una enzima necesaria para formar inositidos fosfatos que participan en la secreción de insulina, al aumentar el nivel de Calcio intracelular.
3. La hiperinsulinemia podría tener un efecto down-regulation (inhibidor), lo que puede frenar su síntesis, es decir, se auto inhibe al estar en exceso.
4. Glucosilación de la insulina, lo que disminuye su acción.
5. Aumento de los radicales libres: La glucosa puede actuar como un radical libre y causar citotoxicidad. En este punto, Poitou y Robertson propusieron^{22,27} el término de “desensibilización” como un paso anterior a la toxicidad como tal, así que la diferencia sería:
 - a. Desensibilización: Debido a una hiperglucemia temporal lo que generaría un trastorno estructural reversible. La falta de sensibilidad a la glucosa por parte de la célula β sería causado mediante los mecanismos de secreción de insulina preformada, pues se ha observado que puede existir disminución en la cantidad de IP3 y Glut-2, necesarios para la liberación de la hormona.
 - b. Glucotoxicidad: A causa de una hiperglucemia crónica que puede generar daño permanente en la estructura, ya que un nivel elevado de glucosa puede

suspender la síntesis de insulina al inhibir el RNAm de la misma, motivo por el cual, la glucosa causaría daño a nivel genético.

Con respecto al último mecanismo propuesto, se ha reportado que, además de la alteración provocada a nivel de la expresión del gen de Glut-2, esa misma alteración activa la Glucocinasa (GK) y causa la inducción de genes que codifican para glucólisis y lipogénesis, junto con la activación temprana de genes que se relacionan con la regulación del ciclo celular (c-myc, c-fos, c-jun), dando como resultado la desdiferenciación en la célula, por lo que comienza a expresar proteínas como la hexocinasa I o la lactato deshidrogenasa, que raramente aparecerían en una célula madura.²¹⁻²⁸

iii. LIPOTOXICIDAD. Los lípidos pueden ser considerados el otro componente importante para regular la función de la célula β . Desde 1963 se planteó la hipótesis de que el aumento de ácidos grasos libres (productos de la degradación del tejido adiposo), debido a la falta de insulina o de su actividad, producían resistencia a la insulina.^{21-23,26} Respecto a la relación que existe entre los ácidos grasos con la insulina, existe una situación paradójica como la que hay con la insulina y la glucosa, pues hasta cierto límite los ácidos grasos estimulan la secreción pero al excederse causan el efecto contrario y se frena la secreción de insulina.^{21,23,26, 28}

Al exponer a la célula a concentraciones agudas de ácidos grasos, éstos tendrían un aparente efecto de factores de acoplamiento de transducción al promover la secreción de insulina que es inducida por la glucosa, por medio de la activación de isoformas de la proteína cinasa C y regular la apertura de los canales de Calcio dependientes de voltaje que

son importantes durante la vía de secreción de insulina. Sin embargo, el exponer a la célula a altas concentraciones de ácidos grasos de manera crónica, se aumenta su captación y oxidación para dar energía, en competencia con la glucosa. Esto lleva entonces no sólo a los cambios que se darían por exposición aguda, sino que puede causar alteraciones fenotípicas que se relacionan con las rutas lipolíticas (alteración en la inducción de genes para proteínas como Carnitina Palmitoiltransferasa 1-CPT-1-, acil-CoA oxidasa peroxisomal –ACO- o la proteína desacopladora 2 –UCP-2-) y como consecuencia la célula β pierde su sensibilidad a la glucosa y reacciona con una hipersecreción de insulina a bajas concentraciones de glucosa, junto con la incapacidad de adaptar la respuesta secretora a la glucemia, favoreciendo entonces la insulinoresistencia. En hígado también se produce más glucosa (neoglucogénesis), promoviendo aún más su intolerancia. ^{21-23,25,26-29}

Existen dos teorías principales por las cuales se explicaría el mecanismo mediante el cual los ácidos grasos libres producen una disminución en la secreción de insulina^{21-,23,25,26,}:

1. Por la disminución en la actividad de los receptores Glut-2
2. Por Cambios en las vías metabólicas de los lípidos

El aumento de los ácidos grasos libres a causa de una lipólisis exacerbada y la disminución de la Acetil Co-A Carboxilasa (ACC) al no requerirse la síntesis de ácidos grasos libres (que se encuentran en exceso), tiene como consecuencia la disminución de malonil Co-A (que es importante para la inhibición de enzima Carnitina Palmitoiltransferasa 1 –CPT-1- y que interviene en el transporte de ácidos grasos de cadena larga), además de la activación de Acetilcarnitina Transferasa 1, que favorece la degradación de ácidos grasos libres,

intensificando la beta oxidación con la subsecuente disminución de derivados acilos de Coenzima A, reduciendo la secreción de insulina.^{26,28,29}

E. GLUCOLIPOTOXICIDAD:

La glucolipotoxicidad es como se le ha denominado a la alteración de la función de la célula β del páncreas ligada a una dieta alta en carbohidratos y lípidos (Figura 8). Es un evento que ocurre únicamente en la célula β del páncreas y se origina cuando existe una exposición crónica a glucosa y ácidos grasos, lo que desencadena una resistencia a la insulina e hiperglucemia.^{21,24-25,27-29}

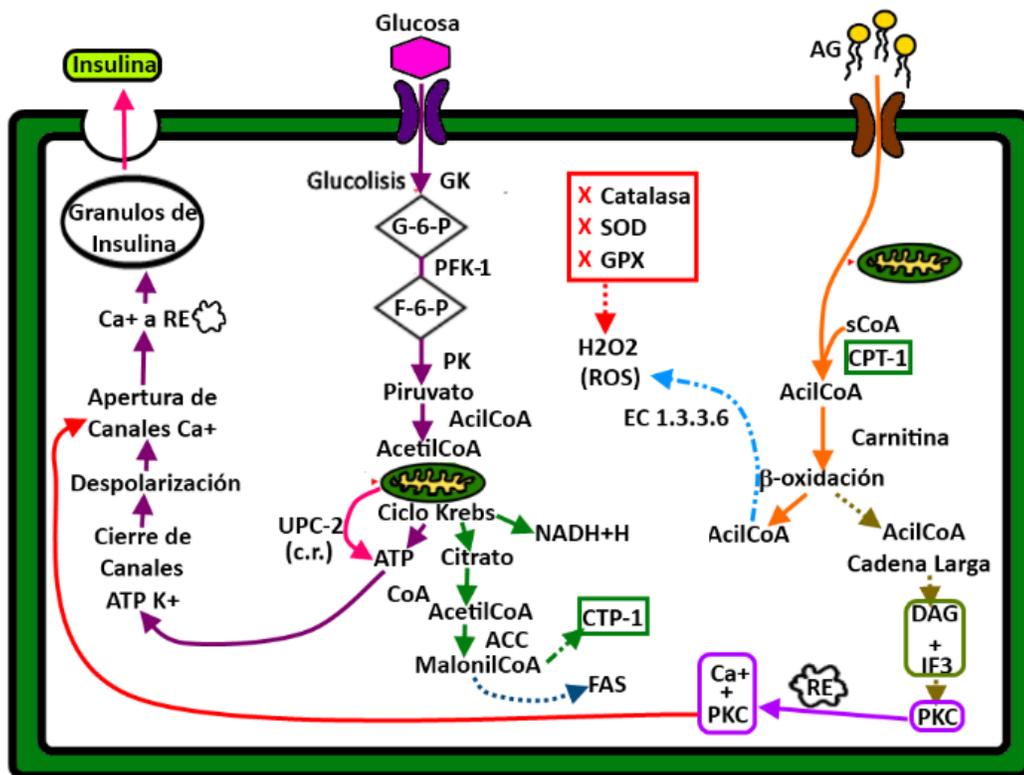


Figura 8. MECANISMOS DE LA GLUCOLIPOTOXICIDAD EN LA CÉLULA BETA DEL PÁNCREAS

De manera fisiológica, la entrada de glucosa a la célula β a través de su receptor de membrana (GLUT-2) la lleva a ser transformada en Acetil Co-A mediante la glucólisis. A su vez, la Acetil Co-A ingresa al ciclo de Krebs, cuya función principal en este sitio -a diferencia de cualquier otro órgano- es liberar ATP para dar la suficiente energía que permitirá el cierre de los canales de Potasio dependientes de ATP, dando paso a la despolarización de la membrana, para abrir los canales y permitir la entrada de Calcio extracelular que actuarán sobre los gránulos de insulina almacenados en el retículo endoplásmico para que sean liberados fuera de la célula β .^{21,24,25,27-29}

Sin embargo, cuando existe una hiperglucemia, se aumenta la producción de superóxido mitocondrial (una especie reactiva de oxígeno –ROS-) que estimulará la expresión del gen de la proteína desacoplante 2 (UCP-2) en la célula β . Cuando la mitocondria se desacopla durante la cadena respiratoria debido a la UCP-2, causa una disminución en la producción de ATP y por lo tanto el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP se verá afectado negativamente, así como el resto de la vía para liberación de los gránulos de insulina fuera de la célula β .²¹⁻²⁹

Por otro lado, otro de los productos del ciclo de Krebs es el Citrato, cuya función en la célula β es transformarse hasta Malonil Co-A (gracias a la Acetil Co-A carboxilasa –ACC-), pero no para la síntesis de ácidos grasos a partir de FAS (Ácido graso Sintasa –Fatty Acid Synthase-), sino para inhibir a la enzima Carnitina Palmitoiltransferasa 1 (CTP-1), que en otros órganos tiene un papel importante en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana al unirlos a la carnitina, pero que no es esencial en la célula β puesto que ésa no es su tarea principal.²¹⁻²⁹

Un tercer producto del ciclo de Krebs es el NADH reducido, que ingresará a la cadena respiratoria, para la producción de ATP.

En cuanto a la función que tienen los lípidos en la célula β , estos ingresan a la beta oxidación, dando lugar a dos productos: ^{21,23-25,27-29}

- Acetil Co-A que será utilizado en el ciclo de Krebs para la producción de ATP, necesario para el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP
- Acil Co-A de cadena larga, que en este caso seguirá su transformación hasta Diacilglicerol (DAG) y junto con el inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) obtenido a partir de la reacción de hidrólisis catalizada por la fosfolipasa C del PIP2 (fosfatidil inositol 4-5 bifosfato), activan a la proteincinasa C (PKC) para que ésta a su vez y junto con el calcio, una vez en el retículo endoplásmico promuevan la salida de los gránulos de insulina hasta la membrana para liberar la hormona.

Cuando existe un exceso de ácidos grasos, éstos siguen entrando a la célula β y transformándose en Acetil Co-A, que en exceso aumentará la actividad de la oxidoreductasa Acil Co-A oxidasa peroxisomal (ACO o EC 1.3.3.6), lo que terminará generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) –ROS- en grandes cantidades. La célula β se verá entonces gravemente afectada por este acúmulo de H_2O_2 , pues contrario a otras células, no cuenta con ninguna enzima antioxidante (Catalasa, Glutatión Peroxidasa –GPX, Superóxido Dismutasa –SOD-) para ayudarle a degradarlo, lo que traerá como consecuencia la degeneración celular e incluso apoptosis. ^{21,23-24-25,27-29}

F. GLUCOSA EN SANGRE Y SU IMPORTANCIA EN ENFERMEDADES COMO LA DIABETES:

El transporte y metabolismo de la glucosa es considerado un evento fisiológico cuidadosamente regulado por el hígado, los tejidos extrahepáticos y hormonas como la insulina, glucágon, adrenalina, glucocorticoides y tiroxinas.^{7-9,12}

Sin embargo, cuando existe una fuerte reducción en el aporte de glucosa en la dieta (hipoglucemia crónica) o, por el contrario, un exceso constante de ésta en sangre (hiperglucemia crónica), degenerará en un círculo vicioso que de continuar así provocará complicaciones metabólicas, un daño irreversible en el organismo y en casos extremos, la muerte.^{2,3,5-9,12,30}

La hipoglucemia crónica puede ser originada debido a: anorexia, estrés, ejercicio exhaustivo, insuficiencia hepática, insulinoma, sobredosis de insulina en pacientes tratados o la llamada hipoglucemia juvenil transitoria. Por el contrario, la hiperglucemia crónica puede ser ocasionada debido a la presencia de algunas patologías como son: hiperadrenocorticismo, falla renal, pancreatitis aguda, feocromocitoma, glucagonoma y diabetes (este último padecimiento, puede ser debido a daño o deficiencia de la función pancreática por causa de tumores, enfermedad autoinmune, origen genético o resistencia a la insulina).^{2,3, 5-9,12,30}

La diabetes es considerada la enfermedad que más se encuentra relacionada a la presencia crónica de altas concentraciones de glucosa en sangre, que puede aumentar debido a la reducción de su entrada en el músculo y el tejido adiposo, junto al aumento de producción de glucosa por parte del hígado pero que no puede ser aprovechada por las células para

obtener energía, ya sea debido a la incapacidad de las células β de producir una cantidad adecuada de insulina o de la capacidad de la insulina para actuar en sus tejidos blanco, así que éstos recurren al uso de ácidos grasos, cetonas y aminoácidos como fuentes de energía alternativa. ^{2,3, 5-9,12,30}

Al no poder ser utilizada la glucosa por las células, se acumulará en sangre, y una de las consecuencias importantes es que se excederá el umbral renal para la reabsorción tubular, lo que provocará que la glucosa salga con la orina (glucosuria).

La presión osmótica ejercida por la presencia de glucosa en la orina también aumenta la diuresis osmótica (pérdida de agua en la orina), reduciendo el volumen de sangre y causando sed en el paciente, lo que a su vez genera un consumo excesivo de líquidos para tratar de compensar ese déficit. ^{2,3, 5-9,12, 30}

La situación se ve exacerbada por el hecho de que las células β del páncreas requieren de insulina y cuando ésta no está disponible, los niveles de glucosa intracelular de estas células permanecen bajos incluso cuando los niveles de glucosa en sangre son adecuados. Debido a esa incapacidad de tomar glucosa del plasma sanguíneo durante la diabetes, las células β interpretan que la concentración de glucosa es baja y aumentan la secreción de glucagón, lo que estimula la gluconeogénesis y aumenta aún más la concentración de glucosa en sangre.

^{1-5,7-,9,12,31,32-34}

Aunado a todos estos problemas, si la enfermedad continúa su curso sin una detección oportuna y/o un control adecuado, puede generar daños permanentes e irreversibles a todos los tejidos y como consecuencia conllevará a enfermedades secundarias que pueden contribuir a mermar aún más el estado del paciente e incluso poner en riesgo su vida. ^{1-5,7-}

^{9,12,32-34}

La diabetes es, por lo tanto, una de las enfermedades cuya prevención, diagnóstico y control es de gran importancia. Además, se debe considerar como una enfermedad que se relaciona fuertemente con la presencia de sobrepeso u obesidad en el individuo, y que además es una enfermedad que ha ido en aumento con el paso de los años. ^{1-5,7-,9,12,32-34}

G. RELACIÓN ENTRE OBESIDAD Y DIABETES:

La obesidad y el sobrepeso, de acuerdo a la Organización Mundial para la Salud, se definen como la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud y se les considera como la primera pandemia no infecciosa del siglo XXI. ^{1,2-5,35,36}

Se ha observado que la prevalencia de la obesidad en la especie canina va de la mano con la presentada en la especie humana ^{37,38}. De acuerdo a la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales, en España entre el 20 y el 40% de los perros padecen sobrepeso u obesidad, sin embargo, esto es un reflejo de la situación a nivel mundial ^{1-5,37-40}

En cuanto a la prevalencia de diabetes en perros, se ha visto de igual forma un incremento con el paso de los años: hace treinta años, se diagnosticaba esta enfermedad en las clínicas veterinarias en 19 de cada 10 000 perros (equivalente a un 0.19 %); para 1999, la prevalencia se había triplicado, alcanzando un valor del 0.58 % ^{35 37-40}

Tomando en cuenta la prevalencia tanto de obesidad como de diabetes en perros y considerando que existen unos 5 millones de perros registrados en ese país, se puede inferir que hay entre 1 y 2 millones de perros con sobrepeso/obesidad, los cuales pueden llegar a desarrollar diabetes. ^{1-5,37-40}

H. DIABETES MELLITUS EN EL PERRO. DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO:

Como ya se ha descrito, la DM es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Sin embargo, éste no es un proceso de curso inmediato.

El síndrome de resistencia a la insulina o síndrome metabólico (SM) se caracteriza de acuerdo a los criterios del National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III, 2005 (NCEP-ATP-2005)^{36,37} modificado para la especie canina, por los siguientes elementos:

- Obesidad: Considerando una condición corporal de 4 puntos en la escala de 5 puntos, de acuerdo a la American Animal Hospital Association (AAHA,2010)^{36,37}
- Hiperglucemia: Cuando existe un nivel de glucosa en sangre en ayunas, de > 6.1mmol/L (109.8 mg/dL)
- Bajos niveles de colesterol: Cuando dichos niveles en ayunas son de < 1.0mmol/L (macho) y de < 1.3 mmol/L (hembras)
- Hipertrigliceridemia: Con un valor en ayunas de > 1.7mmol/L
- Hipertensión: Cuando la presión arterial se encuentra en un nivel de > 150/95 mm/Hg

Es por ello que el SM puede considerarse un paso previo a la diabetes y debe ser tomada en cuenta al momento de realizar un diagnóstico y prevención de la enfermedad.

Con respecto a su clasificación, en la especie humana, la DM se divide generalmente en cuatro tipos⁴¹⁻⁴³:

1. Diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) o tipo 1
2. Diabetes mellitus independiente de insulina (NIDDM) o tipo 2
3. Diabetes secundaria (asociada a determinados síndromes o afecciones como hipoparatiroidismo ó hiperadrenocortiscismo).
4. Diabetes gestacional

Sin embargo, en perros, a pesar de su similitud con la enfermedad descrita en humanos, aún existen muchos factores que no están del todo claros por lo que la clasificación usada en la especie humana no es aplicable del todo. Para la especie canina en el 2013 se realizó una re-clasificación, de acuerdo al Royal Veterinary College de Inglaterra, con base a la causa de la hiperglucemia más que por su respuesta al tratamiento con insulina (Tabla 1) ⁴¹⁻⁴³

Tabla 1. Clasificación de Diabetes Mellitus en perros, de acuerdo al Royal Veterinary College de Inglaterra, con base a la causa de la hiperglucemia (2013) ⁴¹⁻⁴³

<p>HIPERGLUCEMIA POR DEFICIENCIA DE INSULINA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Destrucción de células β inmunomediada - Hipoplasia de células β - Pérdida de células β asociada a lesiones exopancreáticas (necrosis pancreática, pancreatitis) - Procesos ideopáticos
<p>HIPERGLUCEMIA POR RESISTENCIA A INSULINA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Obesidad - Secundaria a otras endocrinopatías - Diabetes gestacional - Iatrogenia (administración de prostágenos sintéticos, glucocorticoides)

Muchos de los perros diabéticos presentan una destrucción inespecífica de los islotes de Langerhans asociada a una reacción serológica a la isoforma 65kDa de GAD y/o al antígeno de insulinoma 2 (IA-2).^{7,43} También se ha encontrado que existen factores genéticos predisponentes como mutaciones en los genes INF- γ e TNF- α o el gen del complejo mayor de histocompatibilidad (conocido también como antígeno leucocítico – DLA-).

Lo anterior indica que la mayoría de los pacientes presentan una DM por deficiencia de insulina, sin embargo, existen razas (y cruzas de ellas) que genéticamente no estarían predispuestas a la enfermedad, pero debido a los hábitos y el tipo de vida que llevan, pueden llegar a presentar primero obesidad y posteriormente desencadenarse en diabetes,

tales como, Cobrador de Labrador, Cobrador Dorado, Chihuahueño, Poodle, Samoyedo o Daschund. Esto es un factor importante a considerar cuando un paciente llega a la clínica con signos que puedan indicar la manifestación de DM, ya que aún no existen muchos estudios que indiquen un diagnóstico preciso para definir el tipo de diabetes que presenta el paciente⁴¹⁻⁴⁴.

Debido a todas las posibles causas y a pesar de la similitud de muchos de los signos de DM entre las especies humana y canina, un buen diagnóstico que incluya pruebas de laboratorio y un examen físico exhaustivo, resulta de vital importancia para asegurar un buen tratamiento que no sólo permita tratar la enfermedad sintomáticamente sino que también de una mejor calidad de vida en el paciente, lo que se verá reflejado positivamente en el estado de ánimo del propietario, quien entonces se mantendrá comprometido con el tratamiento para su perro.⁴²⁻⁴⁵

I. TRATAMIENTO DE DIABETES MELLUTIS EN PERROS:

El tratamiento más comúnmente utilizado para los pacientes con diabetes se compone de los siguientes elementos: 1) Dieta de prescripción (cuya formulación está enfocada a regular la entrada de glucosa con mayor lentitud a través del sistema gastrointestinal); 2) Ejercicio y 3) Administración exógena de insulina, que puede ser de acción corta (conocida como cristalina o regular, actúa a los 30 minutos de ser aplicada y su efecto es de 15 minutos), de acción intermedia (conocida como NHP, actúa a las 2 horas de aplicarse y su efecto dura de 8-12 horas) o de acción ultralenta (conocida como protamina zinc, actúa a las 6 horas de aplicarse y su efecto puede ir desde las 8 a 12 horas o desde las 24-72 horas). Éstas pueden ser aplicadas en un protocolo individual o combinado.^{2,3-4,31-33,36-37,45}

No obstante, a pesar de tener un diagnóstico certero, en ocasiones el tratamiento falla debido a distintas circunstancias como: Resistencia del organismo a la insulina exógena administrada, gracias al desarrollo de anticuerpos por parte del organismo hacia los aminoácidos específicos de la molécula (que casi siempre es de origen porcino) (Tabla2); sedentarismo y continuar con un exceso de alimentación y/o a no adherirse puntualmente al cumplimiento de los horarios de aplicación de la insulina.^{2-4,31-33,36-37,45}

Tabla 2. Variaciones de aminoácidos en las posiciones A8, A9 y B30 de la molécula de insulina según

la especie^{33,42,43}

VARIACIONES DE AMINOÁCIDOS EN LAS POSICIONES A8, A9 Y B30 DE LA MOLÉCULA DE INSULINA				
ESPECIE	A8	A9	A10	B30
Perro	Thr	Ser	Ile	Ala
Cerdo	Thr	Ser	Ile	Ala
Hombre	Thr	Ser	Ile	Thr
Vaca	Ala	Ser	Val	Ala

También se ha visto que otro factor muy importante que puede llevar al fracaso del tratamiento es el elevado costo de los fármacos comúnmente utilizados para disminuir la glucemia en el paciente, hecho que se ve aún más reforzado cuando existe resistencia a los mismos, lo que frustra a los propietarios y por consecuencia provoca que éstos dejen de invertir en la salud de su animal de compañía, con la subsecuente recaída y disminución de calidad y tiempo de vida, especialmente cuando el paciente que presenta la enfermedad es aún joven (que según la literatura, la presentación de la enfermedad suele encontrarse comúnmente en el lapso de los 3 a los 12 años de edad,).^{2-4,31-33,36-37,45}

IV. ANTECEDENTES:

1. USO DE TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS A LA APLICACIÓN DE INSULINA:

Dando registro de los problemas que en muchas ocasiones representa el tratamiento de insulina a largo plazo principalmente sobre la calidad y tiempo de vida del paciente, se contempla la posibilidad de utilizar tratamientos alternativos a la administración de insulina, tales como el uso de productos a base de sustancias de origen natural como las plantas con propiedades hipoglucemiantes, como la sábila (Aloe), el nopal, la piña, entre muchas otras. Estos tratamientos alternativos, al igual que cualquier otro tratamiento para DM, idealmente deben acompañarse de ejercicio y una dieta de prescripción, pero no necesariamente deberían ser causa de una resistencia a la insulina a largo plazo o provocar una toxicidad posterior a su ingesta. ⁴⁶⁻⁵²

De entre las muchas plantas con propiedades hipoglucemiantes que existen, una de las más estudiadas (principalmente en la especie humana) para este fin, es la sábila (entre ellas, una de las variedades más utilizadas es el *Aloe barbadensis*), que puede ser administrada en diferentes presentaciones. ^{46,48,49,51,53,54}

Dentro de los compuestos orgánicos de *Aloe barbadensis* que presentan actividad hipoglucemiante a corto plazo se ha descrito al aloe-emodin (Figura 9), una antraquinona derivada de la aloína, que se obtiene al realizar el proceso de estabilización del gel de Aloe Vera. Algunos de los trabajos realizados que soportan la evidencia del efecto hipoglucemiante del Aloe Vera se muestran a continuación en la Tabla 3: ^{46,48,49,51,53-60}

Tabla 3. Antecedentes de las investigaciones realizadas sobre los efectos hipoglucemiantes de Aloe

Barbadensis PO ^{46,48,49,5160}

GEL DE ALOE VERA		
AUTOR	DOSIS	RESUTADOS
Beppu, 2006	Uso de fracción de 10kDa de extracto de Aloe Vera, por 30 42 días	Existe inhibición a nivel intestinal de glucosa en yeyuno de ratas diabéticas
Kim y col., 2009	25, 50 y 100 mg/día/8 semanas PO	El gel de Aloe reduce la resistencia a la insulina en sangre y de TAG en hígado. Reduce tamaño de adipocitos en ratones diabéticos.
Rajasekaran, 2006	300mg/día/21 días PO	El gel de aloe vera disminuye niveles de glucosa en sangre, colesterol, TAG, ácidos grasos y fosfolípidos en hígado y riñón. Disminuye las VLDL e incrementa las LDL en rata diabética
Choi y Myun-Hee Chung, 2013	250, 500 y 750 mg/kg por 30 días PO e IV	La dosis menor de Aloe vera no muestra efecto para disminuir niveles de glucosa en sangre en ratas y perros; las siguientes dos dosis muestran efecto hipoglucemiante. No se observa toxicidad. Se determina que la mejor dosis es la media (500mg/kg).

Ajabnoor, 1989	500mg/kg PO, una y dos veces al día	Se observa efecto hipoglucemiante con dos dosis al día, más no a una sola dosis, en ratones diabéticos
Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S 2005	300mg/kg/día/21 días. Vía intragástrica	El extracto de gel de Aloe vera disminuye los niveles de glucosa, hemoglobina glucosilada e incrementa la hemoglobina en ratas diabéticas

El mecanismo de acción que provee el efecto hipoglucemiante del aloe-emodin se observa a nivel de las vellosidades intestinales, pues actúa sobre las α -glucosidasas presentes, específicamente en el borde del cepillo, de manera que se une al sitio receptor de estas enzimas y como consecuencia retrasa su función (cortar los enlaces β 1-4 y α 1-6 de los polímeros de glucosa, para dejarla libre y que ingrese a la sangre), por lo que la absorción de glucosa a la sangre es más lenta, contribuyendo de modo favorable en una liberación gradual de insulina para que a su vez permita el paso de glucosa al interior de las células, sin saturarse. (Figura 10) ^{53-58,60,67}

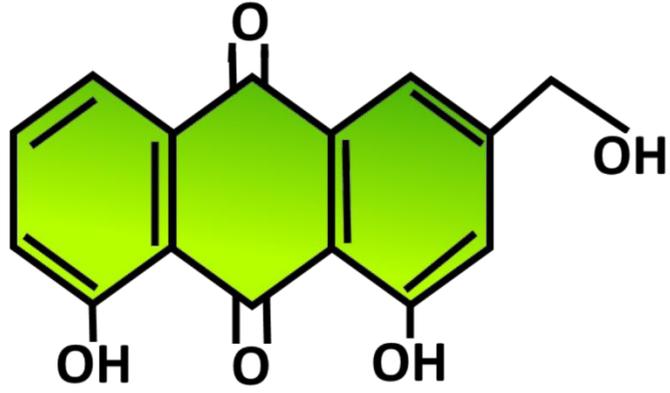


Figura 9. Estructura química del aloe-emodin

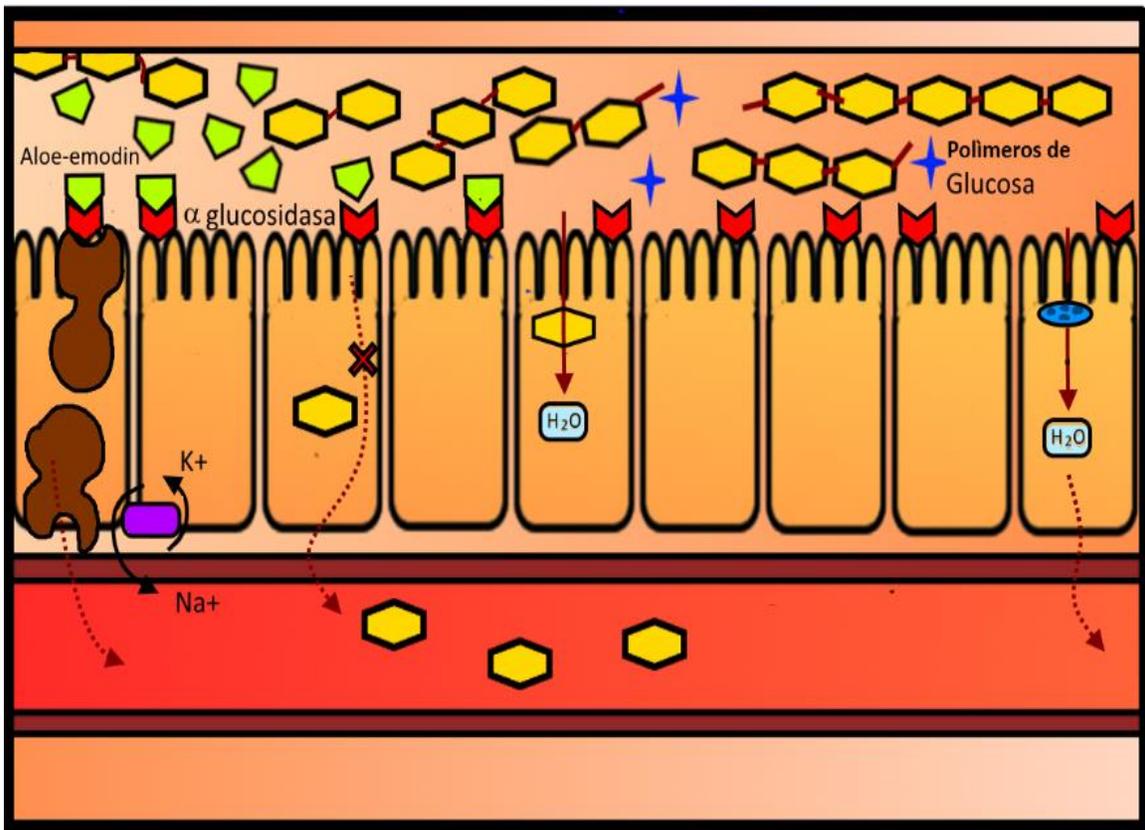


Figura 10. Mecanismo de acción del aloe-emodin sobre la absorción de glucosa en el intestino

Otro producto de origen natural con propiedades hipoglucemiantes muy utilizado en México (principalmente en la especie humana) es el extracto líquido de propóleo⁸⁰⁻⁸³. Existe una gran variedad de extractos de propóleo de acuerdo a su origen, por lo que los compuestos que contiene pueden llegar a variar en cantidad y concentración, pero uno de los principales que se encuentra presente regularmente en todos los extractos, es un ácido hidroxicinámico que es derivado fenólico del ácido caféico, denominado Fenetil éster ácido caféico (CAPE) ⁶⁸⁻⁷² (Figura 11), del cual se ha observado que posee propiedades hipoglucemiantes. Algunos de los trabajos realizados que soportan la evidencia de dicho efecto se resumen en la tabla 4:

Tabla 4. Antecedentes de investigaciones de los efectos hipoglucemiantes del extracto de Propóleo PO

EXTRACTO DE PROPÓLEO		
AUTOR	DOSIS	RESUTADOS
Pacheco y col. , 2011	150 mg/kg/día/ por seis semanas	El tratamiento con propóleo reduce los niveles de insulina e índice HOMA
Eun Soo Lee y col. , 2007	No se menciona	El efecto de CAPE es sobre el ATK (aumenta su fosforilación de manera tiempo-dependiente, pasando de un pico máximo en 1h a un pico máximo en 3 minutos) Otro efecto es sobre la estimulación de la ACC (mayor eficiencia de la β -oxidación) Un tercer efecto observado es impedir la formación de ROS inducidos por

		peroxidación lipídica en tejidos
Tolba y col. , 2013	No se menciona	El CAPE tiene efectos hepatoprotectores, neuroprotectores y antiinflamatorios, al inhibir proteínas como TNF- α , JNK1 o IL6, así como la formación de ROS

El mecanismo de acción por el cual existe un efecto hipoglucemiante por parte del CAPE, se encuentra a nivel celular, durante la activación de la enzima Akt/PKB (Akt/Protein quinasa B) de la vía de activación de insulina. Esto ocurre al acelerar la fosforilación de Akt de forma tiempo-dependiente (pasando de un pico máximo de fosforilación de 1 hora a un pico máximo de fosforilación de 3 minutos), estimulando con mayor velocidad a los receptores Glut-4 y mejorando así una mayor entrada de glucosa al interior celular. ⁶⁸⁻⁷⁴

(Figura 12)

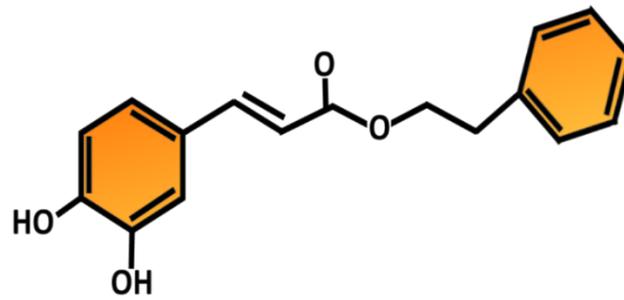


Figura 11. Estructura química del Fenetil éster ácido caféico (CAPE)

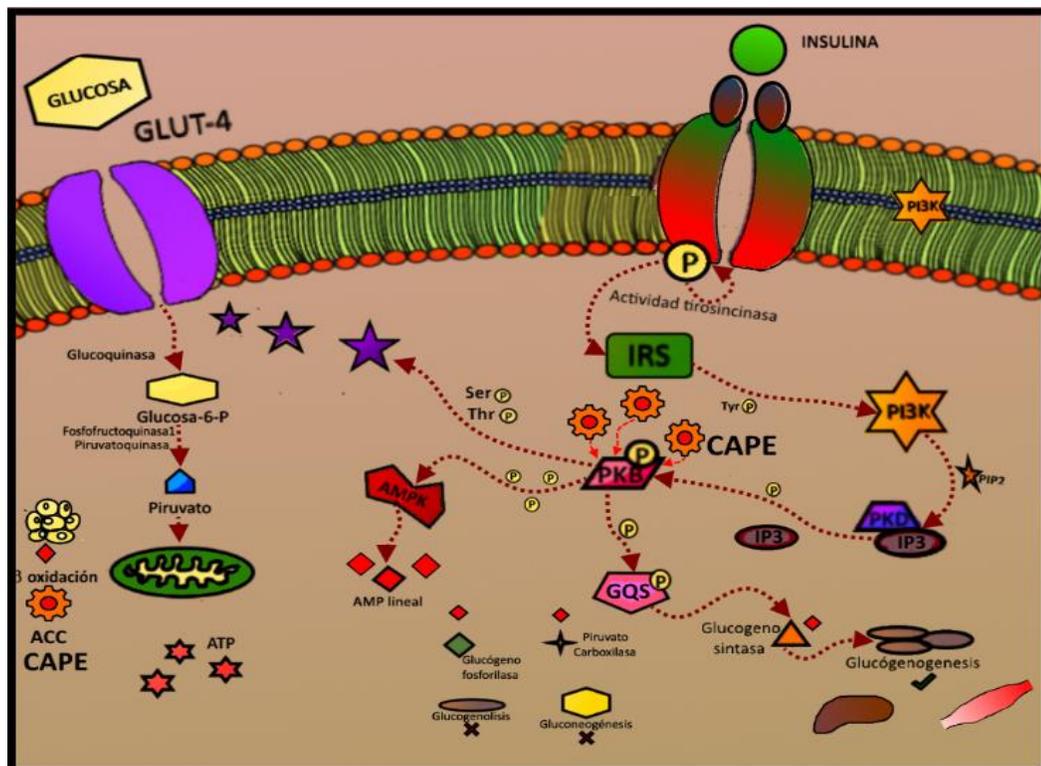


Figura 12. Mecanismo de acción del CAPE a nivel de la vía Akt/PKB de activación de la insulina

2. ESTRÉS OXIDATIVO Y LOS PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL (ALOE VERA Y EXTRACTO DE PROPÓLEO):

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS ó EOR -átomos con un número impar de electrones o que tienen un electrón libre-) y la capacidad de producción de antioxidantes del organismo. Este desequilibrio puede ser ocasionado por un déficit de moléculas antioxidantes o por un incremento exagerado de la producción de radicales libres. Esto tiene como consecuencia alteraciones en las funciones y estructura de las células (principalmente por lipoperoxidación de la membrana celular).⁷⁵⁻⁸⁴

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en el desarrollo de la diabetes, ya que interfiere en la señalización de la insulina y el transporte de glucosa en las células. Durante la diabetes se produce un aumento de radicales libres del oxígeno y nitrógeno principalmente, provocando que se siga manifestando la hiperglucemia crónica característica de dicha enfermedad.⁸³⁻⁸⁷

En grandes proporciones los radicales libres pueden causar daño a las células, por lo que consumir alimentos con propiedades antioxidantes puede ayudar a prevenir ese exceso de radicales libres.⁸³⁻⁹¹

En la especie humana se ha observado (de acuerdo a diversos estudios) que el consumo de gel de Aloe Vera, aparte de tener efecto hipoglucemiante, aumenta la biodisponibilidad de las vitaminas C y E (antioxidantes naturales obtenidos de la dieta), así como la producción de enzimas antioxidantes hepáticas como catalasa, superóxido dismutasa (SOD) o glutatión peroxidasa (GPX). También se ha observado que posee un efecto favorable en la

disminución de la hemoglobina glucosilada (un analito que indica la cantidad de glucosa en sangre del paciente durante los tres últimos meses, cuyo valor en condiciones fisiológicas es menor a 5.7%) en pacientes humanos con diabetes, en los cuales dicho analito puede llegar arriba del 6.5%.⁹²⁻⁹⁷

En cuanto al extracto de propóleo, aparte de su efecto hipoglucemiante se ha observado (de acuerdo a la literatura) que el CAPE administrado a largo plazo puede inhibir la lipoperoxidación de la membrana celular reduciendo las especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARs) y aumentando el GPX reducido; también puede disminuir de manera significativa los niveles de óxido nítrico –NO- y malondialdehído producidos durante la diabetes y que causan inflamación y producción de citoquinas (sustancias que entonces se vuelven tóxicas para el organismo y provocan apoptosis celular). Asimismo, en los estudios consultados se observó que el CAPE puede reducir la expresión del RNA para los factores de necrosis tumoral TNF- α and IFN- γ en el cerebro, los cuales también pueden provocar inflamación y apoptosis celular.⁹²⁻¹⁰⁰

3. USO DE HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS PARA LA LECTURA DE GLUCOSA EN SANGRE EN PERROS:

Resulta importante que el médico veterinario dedicado a la clínica de pequeñas especies pueda contar con una herramienta de diagnóstico confiable y rápido para tomar acciones oportunas y acertadas en cuanto al protocolo a seguir con un paciente que presente alteraciones en sus niveles de glucosa en sangre, por distintas causas.^{6,46}

En México, el diagnóstico de los niveles de glucosa en sangre en perros se lleva a cabo mediante dos métodos principalmente:¹⁰¹

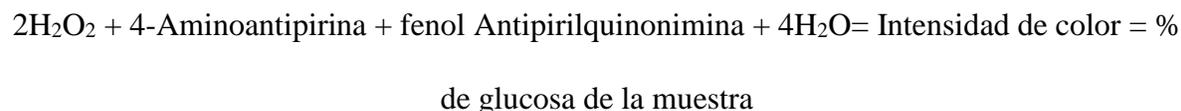
- Método químico tradicional (Bioquímica Sanguínea), que se lleva a cabo en un laboratorio de diagnóstico de patología clínica
- Método electroquímico rápido con tiras reactivas, que se lleva a cabo con ayuda de un glucómetro (el cual en la mayoría de los casos es el recomendado para uso humano)

a. Método Químico tradicional (MQT): Esta técnica utilizada para la medición de la Glucosa, forma parte del grupo de las pruebas de Bioquímica clínica, que se define como aquella parte de la patología clínica que se encarga del estudio de la composición química de la fracción no figurada de la sangre (plasma) como una ayuda paraclínica.^{2,12-13,16-18,19} La utilización de los análisis desarrollados en la bioquímica clínica permite conocer la naturaleza del proceso patológico, establecer el diagnóstico definitivo en combinación con otros antecedentes, establecer y evaluar el pronóstico, hacer un seguimiento de la terapia establecida y desarrollar medidas de control.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

El fundamento de la prueba MQT para medir la glucosa en sangre, se basa en que la glucosa oxidasa –Gox-, utiliza como indicador una oxidoreductasa, que se extrae generalmente del hongo *Aspergillus niger* y que cataliza la oxidación de la glucosa para formar peróxido de hidrógeno y D-glucono-δ-lactona. La D-glucono-δ-lactona se encuentra normalmente en las células para contribuir a degradar los azúcares hacia sus metabolitos, además de catalizar la oxidación de la glucosa de acuerdo con la siguiente reacción:^{101,102}



El peróxido de hidrógeno formado reacciona con el 4-aminoantipirina y el fenol, bajo la acción catalítica de la peroxidasa (oxidación) y forman un antipirilquinonimina rojo cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra.



Este método de laboratorio suele ser muy útil para obtener un resultado confiable, sin embargo se deben cuidar algunos aspectos relacionados a la toma de la muestra y su transporte para asegurar mayor precisión y evitar lo más posible interferencias que afecten el resultado, entre los que destacan: el tipo de tubo donde se depositará la muestra; la rapidez con la que se toma la muestra, así como el tamaño y el tipo de jeringa; el tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su recepción en el laboratorio para ser trabajada (idealmente debe ser menor a dos horas); así como también el grado de relajación del paciente al momento de la toma de muestra; las medidas de asepsia previas a la toma de muestra; entre otras.^{31,101,102,104}

b. Método electroquímico rápido con tiras reactivas (MER): Las Tiras Reactivas son sensores tipo microchips que permiten realizar con una gota de sangre capilar las determinaciones de glucemia. El principio de esta prueba consiste en que cada tira reactiva contiene en uno de sus extremos un reactivo especial (una enzima, generalmente glucosa oxidasa) que actúa con la muestra de sangre que se depositó en el sitio indicado y que subió por capilaridad a lo largo de la tira, generando una corriente electroquímica de muy baja intensidad que será proporcional a la cantidad de glucosa que existe en la muestra (poca cantidad de glucosa implica una menor intensidad de corriente y viceversa). Este voltaje es interpretado por el medidor (en este caso, glucómetro de tecnología electroquímica) y es así como se puede dar la lectura del nivel de glucemia. Dicho resultado puede estar expresado en mg/dL o mmol/L, de acuerdo a la configuración del medidor. ^{6,101,104-107}

El sistema de medición de la tira reactiva está diseñado para corregir influencias de factores externos que puedan perturbar la medición (temperatura, humedad, azúcares diferentes a la glucosa, vitamina C, hematocrito, tipo de sangre de donde proviene la muestra – capilar o venosa-) gracias a que posee varios electrodos que permiten discriminar otras sustancias diferentes a la glucosa y a que muchas veces la calibración del medidor integra ya un factor de corrección para plasma en lugar de sangre total, permitiendo que la lectura tomada en el momento sea comparable directamente con los resultados obtenidos por la química sanguínea. ^{6,101,104-107}

La muestra de sangre que se requiere para esta prueba, es solo una gota. La lectura se obtiene –dependiendo del medidor- entre 3 y 5 segundos después de depositada la muestra. En cuanto a los cuidados básicos para una lectura confiable, los fabricantes recomiendan que las tiras reactivas permanezcan cerradas mientras no se usan, que no se mantengan

fuera del envase por periodos prolongados, procurar no tocar la zona donde se deposita la muestra, mantener el envase y las tiras en un lugar seco y que una vez abierto el envase las tiras se usen en un periodo máximo de 90 días. ^{6,101,104-107}

Aunque los métodos electroquímico rápido y químico tradicional poseen ventajas y desventajas para monitorear las concentraciones sanguíneas de glucosa en los pacientes. ^{6,101,105-112} el presente estudio tiene entre sus objetivos la validación mediante un ensayo *in vitro* de la prueba rápida de medición de glucosa por tiras reactivas, así como la comparación de ambos métodos para confirmar el uso de la prueba rápida como un método confiable, seguro y rápido para obtener una buena lectura de la concentración de glucosa en el paciente veterinario (perros). La importancia de lo anterior reside principalmente en que en México se recurre al método de lectura rápida de glucosa en sangre mediante tiras reactivas con glucómetro para uso humano como una alternativa a los análisis tradicionales de laboratorio, ya sea para casos donde saber el resultado lo más rápido posible es crucial para el diagnóstico y tratamiento a seguir (por ejemplo en una emergencia), como para diagnóstico y monitoreo de los pacientes con enfermedades crónicas como la diabetes, en las cuales se requiere en ocasiones realizar varias pruebas en un corto periodo de tiempo y el uso del glucómetro disminuye notablemente los costos de cada prueba comparado al método de laboratorio (Bioquímica Sanguínea). Parte de la problemática a considerar es que el uso del glucómetro está dirigido a la especie humana, lo que implica un error de lectura con respecto al valor real, estimado que puede ser de hasta un 15% ^{6,101,104,107-112}, debido al cambio de especie. Por lo tanto la validación del MER al que recurren los médicos veterinarios en México es necesario para brindar confianza en su uso, debido a que genera un menor costo y puesto que no se cuenta muchas veces con un glucómetro de uso

específico para pacientes veterinarios o con las tiras reactivas que éste utiliza (éstas deben ser importadas, lo que dificulta su adquisición en el país, aumentando el tiempo, el costo de dichos insumos y la disponibilidad para permitir que el médico veterinario las utilice).

V. JUSTIFICACIÓN:

En los perros obesos se puede observar que existe una resistencia a la insulina. Sin embargo, al no presentar signos clínicos evidentes a corto plazo, éstos pueden pasar desapercibidos por los propietarios, por lo que una vez que tales signos se manifiestan suelen ser indicativo de una enfermedad ya muy avanzada. Esta situación tiene como consecuencia que el protocolo a seguir para su tratamiento requiera de un mayor número de elementos para poder primeramente, estabilizar al animal hasta un punto donde la enfermedad se encuentra presente pero sus signos ya no representan un riesgo para la integridad del paciente (debido a los eventos patológicos primarios y secundarios asociados a ésta) y en segundo lugar, para ajustar las dosis de la insulina que se requieren para mantener al paciente estable desde ese momento en adelante (lo que tendrá repercusión sobre su calidad de vida, durante su tiempo de vida restante).

Lo anterior representa una mayor inversión para el dueño del animal en dinero y tiempo, además de que la administración del tratamiento en casa puede llegar a complicarse, ya sea por la poca cooperación del perro al momento de administrarle la insulina, por resistencia del organismo a dicha insulina o por situaciones que impidan al propietario dar el tratamiento en tiempo y forma adecuados.

Se pretende, por lo tanto, buscar alternativas al tratamiento tradicional con insulina, en éste caso el uso de sustancias de origen natural con efectos hipoglucemiantes por vía oral (PO), que además sean económicamente accesibles para el dueño.

Dado que tanto el gel de Aloe Vera como el extracto de propóleo se encuentran disponibles ampliamente en México y se han utilizado, con buenos resultados, como tratamiento alternativo en la especie humana para controlar los niveles de glucosa en sangre, en el presente estudio se procedió a realizar la evaluación del efecto de cada uno de estos productos sobre los niveles de glucosa en pacientes veterinarios (perros), sobre los cuales existe nula información al respecto de su uso como tratamiento preventivo y/ó alternativo para enfermedades como obesidad y DM.

Asimismo, se consideró importante realizar una comparación del efecto hipoglucemiante entre los tratamientos establecidos, para cada una de las etapas del estudio y también entre dichas etapas.

El presente estudio es considerado como un Ensayo Clínico de Fase II. Al no contarse con un protocolo ya establecido en pacientes veterinarios para el uso de los productos de origen natural con efecto hipoglucemiante que se utilizaron, se llevaron a cabo estudios previos para determinar las dosis adecuadas (en cantidad y tiempo puntual de aplicación según circunstancias) para cada uno de los tratamientos. También se llevó a cabo la evaluación previa de la toxicidad aguda de los mismos sobre los pacientes, mediante la realización de análisis clínicos (bioquímica sanguínea, hemograma y hemoglobina glicosilada) para observar los posibles cambios que existieran en ellos, debido al efecto de los diferentes tratamientos administrados, sobre el organismo.

También se comprobó la eficacia del uso de pruebas rápidas para medición de glucosa como el glucómetro, ya que ésta resulta una herramienta valiosa para el médico veterinario dedicado a pequeñas especies que requiera realizar el diagnóstico y/o monitoreo de un paciente que presente hiperglucemia.

VI. HIPOTESIS:

El uso de productos[®] de origen natural con propiedades hipoglucemiantes como el Aloe Vera (*Aloe barbadensis*) y el extracto de propóleo (*Propolis*) por vía oral son una opción viable para el control de los niveles de glucosa en sangre en perros

VII. OBJETIVOS:

a. Objetivo general:

- Evaluar el efecto de dos productos[®] de origen natural con propiedades hipoglucemiantes (*Aloe barbadensis* y extracto líquido de propóleo) sobre el control de los niveles de glucosa y analitos sanguíneos, en perros de diferentes condiciones corporales, a partir de curvas de tolerancia a la glucosa, utilizando un método rápido de medición de glucosa en sangre (tiras reactivas con glucómetro).

b. Objetivos específicos:

- Comprobar la eficacia del uso de una prueba rápida de medición de glucosa en sangre (tiras reactivas con glucómetro) como una opción válida para el diagnóstico

y/o monitoreo del paciente que llegue a la clínica veterinaria y presente hiperglucemia.

- Evaluar el efecto de dos productos[®] de origen natural con propiedades hipoglucemiantes (*Aloe barbadensis* y extracto líquido de propóleo) sobre el control de los niveles de glucosa en sangre en perros considerados en peso ideal y clínicamente sanos (etapa 1), mediante su administración vía oral –PO- y la realización de curvas de tolerancia a la glucosa (iniciales y por cada tratamiento administrado)
- Comparar los resultados de los diferentes tratamientos contra un grupo control (perros no tratados).
- Evaluar el efecto de dos productos[®] de origen natural con propiedades hipoglucemiantes (*Aloe barbadensis* y extracto líquido de propóleo) sobre el control de los niveles de glucosa en sangre en perros considerados con sobrepeso y clínicamente sanos (etapa 2), mediante su administración PO y la realización de curvas de tolerancia a la glucosa (iniciales y por cada tratamiento administrado)
- Comparar los resultados de los diferentes tratamientos contra un grupo control (perros no tratados).
- Evaluar el efecto de dos productos[®] de origen natural con propiedades hipoglucemiantes (*Aloe barbadensis* y extracto líquido de propóleo) sobre el control de los niveles de glucosa en sangre en perros considerados con obesidad y clínicamente sanos (etapa 3), mediante su administración PO y la realización de curvas de tolerancia a la glucosa (iniciales y por cada tratamiento administrado)

- Comparar los resultados de los diferentes tratamientos contra un grupo control (perros no tratados).
- Comprobar la eficacia del uso de una prueba rápida de medición de glucosa en sangre (tiras reactivas con glucómetro) como una opción válida para el diagnóstico y/o monitoreo del paciente que llegue a la clínica veterinaria y presente hiperglucemia.
- Comprobar la inocuidad de cada uno de los tratamientos administrados, a partir de los resultados para cada analito de Química Sanguínea –QS-, Hemograma –HG- y Hemoglobina glicosilada –HgAc1-, observando la presencia ó ausencia de signos de toxicidad aguda.

VIII. METODOLOGIA:

El presente estudio se clasificó como un Ensayo Clínico de Fase II ¹¹³, dividido en tres etapas (Etapa 1: Perros considerados en peso ideal, clínicamente sanos; Etapa 2: Perros considerados con sobrepeso, clínicamente sanos; Etapa 3: Perros considerados con obesidad, clínicamente sanos). La determinación de la condición corporal (CC) fue con base a la escala de cinco puntos y fórmulas de morfometría para determinación de la grasa corporal ^{115,116}(Anexos 1 y 2).

Para determinar el número de pacientes por etapa (n=8) a participar en el presente estudio, se utilizó la constante proyectada por el programa Epidat[®], a partir de los datos obtenidos

tanto de la búsqueda en hospitales y clínicas veterinarias, así como datos de prevalencia de la DM en la especie canina a nivel nacional e internacional. Se elaboraron Formatos de Registro Clínicos (CRF) y de Consentimiento para participar en el estudio, los cuales se repartieron y fueron firmados por los propietarios o responsables de cada paciente o candidato a participar en el presente estudio, según los exámenes clínicos y pruebas de gabinete (Bioquímica –QS-, Hemograma –HG-, Hemoglobina glicosilada -HgAc1-) previas al estudio y de acuerdo a los lineamientos del Subcomité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación del Posgrado la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (CICUA, FMVZ-UNAM)¹¹⁷ así como de la NOM-062-ZOO-1999.¹¹⁸

Se acordó con los propietarios su conformidad para proporcionar un alimento balanceado (Nupec Óptimo Adulto® Nutec México) una semana antes y durante el tiempo que se llevo a cabo el proyecto (seis semanas) con el fin de estandarizar y controlar dicha variable. Con el propósito de establecer las cantidades de alimento que consumiría cada paciente, se realizaron cálculos para obtener las Necesidades Energéticas Diarias de cada perro, así como del aporte de energía del alimento y la cantidad en tazas a las que eso equivale.¹⁻⁴ (Anexo 3)

Los tratamientos evaluados fueron:

- Administración de extracto de *Aloe barbadensis*® (a una dosis de 0.5mL/kg peso del producto activo –PC- PO, equivalentes a 500mg/kg de sustancia activa –SA-).
- Administración de extracto líquido de propóleo de abeja® (a una dosis de 0.14mL/kg de PC PO, equivalentes a 10mg/kg de SA).

- En cada etapa se utilizaron también grupos controles para compararlos con los distintos tratamientos evaluados. A dichos grupos sólo se les administró el bolo de glucosa PO (1000 mg/kg glucosa)¹¹⁹⁻¹²¹. La presentación fue con jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF 42) de la marca Karo® Lotes L6075 F043 (Etapa 1) y L7089 F057 (Etapas 2 y 3). Para el análisis estadístico se utilizó el modelo de medias repetidas para pruebas cruzadas (análisis estadístico para un diseño experimental completamente al azar de 1 factor y 3 niveles, incluyendo el control)^{113,114} (Figura 13).

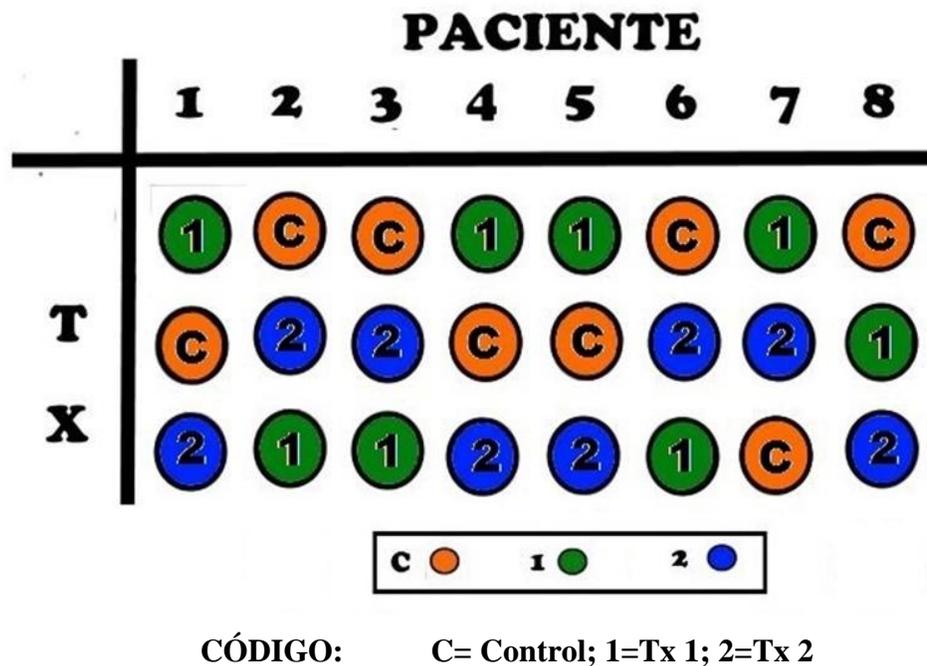


Figura 13. Modelo estadístico de medias repetidas para pruebas cruzadas, correspondiente a los diferentes tratamientos a administrar

IX. FASE EXPERIMENTAL:

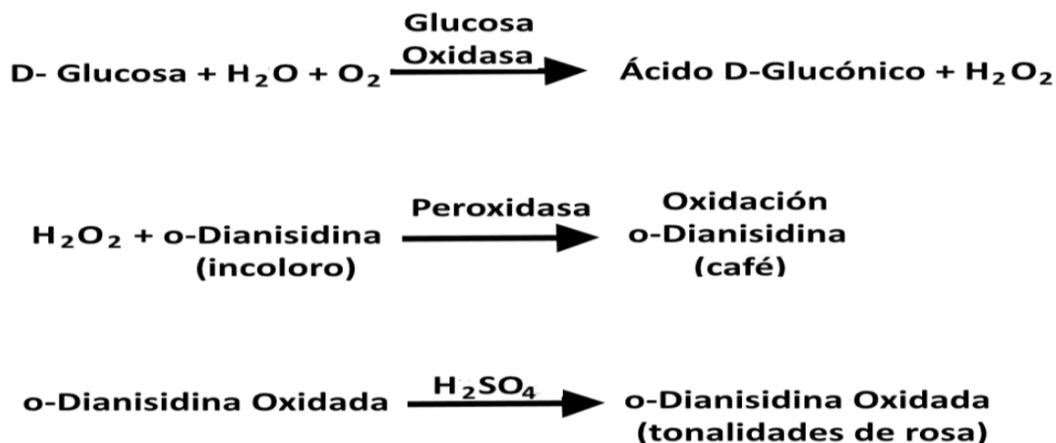
A. PREVIO A LAS ETAPAS:

1. Se realizaron pruebas preliminares para determinar el tiempo de aplicación de la dosis de los tratamientos propuestos (n=8): Se consideró si sería previo a la administración de glucosa (30, 15 ó 5 minutos antes) o de forma simultánea a la administración del bolo de glucosa o posterior a la administración del bolo de glucosa (30, 15 o 5 minutos después)
2. Se realizó la **validación parcial de la prueba rápida de medición de glucosa con glucómetro, a partir de la validación del estándar de glucosa *in vitro* (GAGO 20, Sigma-Aldrich®)¹²²:**

VALIDACIÓN PARCIAL DE LA PRUEBA RÁPIDA DE MEDICIÓN DE GLUCOSA CON GLUCÓMETRO

Con la intención de realizar la validación *in vitro* de la medición de la glucosa a través del equipo electroquímico rápido (glucómetro), se utilizó el estándar de glucosa y a través del método *GAGO 20, Sigma-Aldrich®*¹²². El fundamento de la prueba se basa en la oxidación de la glucosa en ácido glucorónico y peróxido de hidrógeno a través de la enzima glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno reacciona con la o-dianisidina en la presencia de peroxidasa dando como resultado un producto con color (rosa). La o-dianisidina oxidada reacciona con el ácido sulfúrico para estabilizar el producto de color. La intensidad de color final (rosa a intenso/fucsia a rosa transparente), a 540nm (espectrofotómetro) es

proporcional a la concentración de glucosa en la muestra analizada^{103-112,122,123}. El fundamento de la prueba consiste en la siguiente reacción:



Procedimiento:

- a. **Preparación del reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa (Kit G3660 para la preparación de STD de glucosa, Sigma-Aldrich[®], México):** Se utilizó una cápsula de 1g, la cual contenía 500 unidades glucosa-oxidasa (proveniente de *Aspergillus niger*) equivalentes a 0.83 g/1g, así como 100 unidades de peróxido y sales búfer equivalentes a 0.316 g/1g (Sigma-Aldrich[®] México).

Se mezcló el contenido de la cápsula en una botella ámbar con 39.2 mL de agua desionizada a una concentración de 12 N. Se apartó mientras se preparaba el reactivo de o-Dianisidina.

- b. **Preparación del reactivo de o-dianisidina (D 2679 Sigma-Aldrich[®] México):** Se utilizó un Vial de 5mg de o-dianisidina dihidroclorhídrico (o-D). Se

reconstituyó el contenido con 1 mL de agua desionizada al 12 N, se agitó hasta homogenizar. Se apartó mientras se preparó el estándar de glucosa.

- c. **Preparación del estándar de glucosa (STD) ([d-glucosa] G 3285 Sigma-Aldrich® México):** Este paso se realizó previamente a la mezcla del reactivo GO/P con el de o-D. Se agregó 1.0 mg/mL del estándar de glucosa en 0.1% de ácido benzoico, se homogenizó suavemente y se dejó aparte mientras se preparaba el reactivo de prueba.
- d. **Preparación del reactivo de prueba (mezcla de los reactivos de Glucosa Oxidasa/peroxidasa (GO/P) y o-D):** Éste paso se realizó aparte y posterior a la preparación del STD. Se tomaron 0.8 mL de o-D y se agregaron a un matraz que contenía el total del reactivo de GO/P (39.2 mL).

Se homogenizó agitando suavemente. Se dejó reposar y se procedió a realizar las diluciones correspondientes para el STD.

- e. **Preparación de las diluciones para la curva estándar de glucosa (STD):** Una vez preparados tanto el reactivo de prueba como el estándar de glucosa, se colocaron diez tubos de ensayo en una gradilla, debidamente identificados para realizar cada dilución y su respectiva repetición.

Los tubos fueron ordenados de manera ascendente con base a la cantidad de STD que se les fue agregando como primer paso, de acuerdo a la tabla 5 de diluciones:

Tabla 5. Diluciones para realizar el estándar de glucosa

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN
Blanco 1	2mL (GO/P + o-D)
Blanco 2	2mL (GO/P + o-D)
STD1	0.02mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD 1' (repetición)	0.02mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD 2	0.04mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD 2' (repetición)	0.04mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD 3	0.06mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD 3' (repetición)	0.06mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD4	0.08mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)
STD 4' (repetición)	0.08mL (STD) + 2mL (GO/P + o-D)

Una vez que cada tubo estuvo en orden y conteniendo su respectiva cantidad de STD, se procedió a realizar la reacción: Al tiempo cero se tomaron 2.0 mL del reactivo de prueba con una micropipeta y se agregaron al primer tubo, así como a su respectiva repetición (STD 1 y STD 1) y posteriormente se homogenizaron. Se repitió el proceso con los tubos restantes, siguiendo el orden establecido y dejando un intervalo de tiempo de 60 segundos al momento de agregar el reactivo de prueba entre cada uno de ellos.

Al terminar de agregar el reactivo de prueba a todos los tubos, se procedió a colocarlos en baño María y se dejaron ahí por exactamente 30 minutos a 37°C.

- f. **Detener la reacción:** Se añadieron 2.0 mL de ácido sulfúrico (25, 810-5 Sigma-Aldrich® México) a una concentración 12 N a cada tubo, repitiendo el orden establecido previamente en las diluciones, dejando pasar 60 segundo entre cada uno. Una vez hecho esto, se midió la absorbancia de cada dilución del STD a una longitud de onda de 540 nm, realizando un barrido con un espectofotómetro en la región visible y se compararon los resultados con los blancos.

Para la medición de la absorbancia se utilizaron un espectrofotómetro UV visible marca Agilent Cary 100 y el software Cary WinUV. La validación *in vitro* del estándar de glucosa fue realizada en el Laboratorio de Ensayos Farmacéuticos, FES Cuautitlán-UNAM.

B. ETAPAS 1, 2 y 3:

- Para la etapa 1 se estableció un modelo piloto para evaluar el efecto del extracto de *Aloe barbadensis*[®] y extracto de propóleo[®], sobre los niveles de glucosa en sangre en perros. Se utilizaron 8 perros considerados de tamaño mediano (entre 8 y 25 kg), clínicamente sanos (determinado a partir de un examen físico general y pruebas de laboratorio), considerados en peso ideal (CC 3/5, de acuerdo al sistema de cinco puntos de condición corporal en perros^{115,116}).

Se realizó la comprobación de la eficacia del uso de la prueba rápida con tiras reactivas y glucómetro como método válido para el diagnóstico y/o monitoreo del paciente veterinario que presente hiperglucemia, mediante la comparación de los resultados de medición de glucosa en sangre obtenidos durante las curvas de tolerancia para dicho analito, tanto con el uso del glucómetro (Accu-Check[®] Active) como a partir de los resultados obtenidos del laboratorio de diagnóstico (QS).

Se compararon los resultados de cada analito obtenido a partir de la QS, HG y HgAc1 de cada paciente, para cada uno de los tratamientos y se observó la presencia o ausencia de signos de toxicidad aguda, de acuerdo a los valores de

normalidad manejados por el laboratorio de diagnóstico donde se realizaron los estudios.

- Para la etapa 2 se realizó la evaluación del efecto del extracto de *Aloe barbadensis*® y extracto de propóleo®, sobre los niveles de glucosa en sangre en perros. Se utilizaron 8 perros considerados de tamaño mediano (entre 8 y 25 kg), clínicamente sanos (determinado a partir de un examen físico general y pruebas de laboratorio), considerados en sobrepeso (CC 4/5, de acuerdo al sistema de cinco puntos de condición corporal en perros^{115,116}).
- Para la etapa 3 se realizó la evaluación del efecto del extracto de *Aloe barbadensis*® y extracto de propóleo®, sobre los niveles de glucosa en sangre en perros. Se utilizaron 8 pacientes caninos considerados adultos (mayores de 1 año) con obesidad, clínicamente sanos. Se utilizaron 8 perros considerados de tamaño mediano (entre 8 y 25 kg), clínicamente sanos (determinado a partir de un examen físico general y pruebas de laboratorio), considerados en obesidad (CC 5/5, de acuerdo al sistema de cinco puntos de condición corporal en perros^{115,116}).

Todos los animales utilizados durante la investigación fueron alojados bajo las mismas condiciones y se les proporcionó el mismo tipo de alimento comercial formulado para perros adultos (Nupec Óptimo Adulto® Nutec México), de acuerdo al Reglamento del CICUA, FMVZ-UNAM¹¹⁷ y de la NOM-062-ZOO-1999¹¹⁸. Dicho alimento se administró previo (una semana) y durante todo el experimento (seis semanas).

Durante el desarrollo de cada etapa del estudio, a cada perro del grupo se le realizó una primera curva de tolerancia a la glucosa para determinar sus parámetros basales.

Posteriormente se les realizaron curvas de tolerancia a la glucosa después de la administración PO de cada uno de los tratamientos administrados y para el grupo control (las tomas de muestra fueron realizadas a los tiempos: 0, 15, 45, 90 y 120 minutos). El tiempo de lavado entre cada tratamiento (incluyendo el control) fue de una semana.

En la etapa 1, para realizar las curvas de cada tratamiento, se llevó a cabo la toma de muestra de sangre para pruebas de Hemograma (HG) y Química Sanguínea (QS) en cada momento de registro de la curva de cada tratamiento. También se realizó la lectura de glucosa en sangre a partir de una prueba rápida con tiras reactivas y glucómetro, en cada momento de registro de la curva. Posteriormente se compararon dichos valores con los obtenidos a partir de los arrojados por las pruebas de laboratorio para HG y QS.

A continuación, se realizaron comparaciones entre las curvas de cada tratamiento para cada uno de los perros, para determinar su efecto.

Durante la etapa 2, para las curvas de cada tratamiento, se llevó a cabo la toma de muestra de sangre para pruebas de Hemograma (HG) y Química Sanguínea (QS). Dichas tomas de sangre fueron realizadas al principio de la curva de cada tratamiento (primera toma, correspondiente al punto basal, tiempo 0) y al finalizar el tratamiento (última toma realizada durante el registro de la curva, a los 120 minutos). También se realizó la lectura de glucosa en sangre a partir de una prueba rápida con tiras reactivas y glucómetro, al momento de cada toma de muestra para el registro de los puntos que conformaban cada curva de cada tratamiento. Posteriormente se compararon los valores obtenidos a partir de la prueba rápida, con los obtenidos por las pruebas de laboratorio para HG y QS.

A continuación, se realizaron comparaciones entre las curvas de cada tratamiento para cada uno de los perros, para determinar su efecto.

En la etapa 3, para las curvas de cada tratamiento, se llevó a cabo la toma de muestra de sangre para pruebas de hemograma (HG) y química sanguínea (QS). Dichas tomas de sangre fueron realizadas al principio de la curva de cada tratamiento (primera toma, correspondiente al punto basal, tiempo 0) y al finalizar el tratamiento (última toma realizada durante el registro de la curva, a los 120 minutos) para comprobar el estado de salud del paciente antes, durante y al finalizar el experimento. También se realizó la lectura de glucosa en sangre a partir de una prueba rápida con tiras reactivas y glucómetro, al momento de cada toma de muestra para el registro de los puntos que conformaban cada curva de cada tratamiento.

Posteriormente se realizaron comparaciones entre las curvas de cada tratamiento para cada uno de los perros, para determinar su efecto.

Para el análisis estadístico^{113,114} se utilizó el modelo de medias repetidas para pruebas cruzadas (análisis estadístico para un diseño experimental completamente al azar de 1 factor y 3 niveles) y los datos se corrieron en el programa Statgraphics Centurion®.

C. COMPROBACIÓN DE EFICACIA DEL MÉTODO RÁPIDO DE LECTURA DE GLUCOSA EN SANGRE EN PERROS (DERIVADO DE LA ETAPA 1 DEL ESTUDIO):

Los métodos comparados fueron¹²³:

- Método de determinación de glucosa químico tradicional (Bioquímica Sanguínea) (MQT)
- Método electroquímico rápido de medición de glucosa, mediante tiras reactivas (uso de kit de glucómetro y tiras reactivas Accu-Check[®] Active) (MER)

Para la colecta de las muestras sanguíneas necesarias para llevar a cabo el MQT, se utilizaron agujas de canalización 21G conectadas a un tapón Giratek[®] que se mantuvieron fijas en la vena yugular del paciente para disminuir el estrés del paciente y facilitar la toma de cada muestra. Se rasuró el área yugular para eliminar el exceso de pelo y como parte del protocolo de asepsia, así como el uso de una gasa para embrocar el área de punción con una solución de digluconato de clorhexidina al 2%, en sentido contrario al crecimiento del pelo y en forma circular del centro hacia la periferia, dejándolo actuar por 2 minutos antes de volver a aplicar la clorhexidina. La vena fue revisada y desinfectada en cada toma de muestra para evitar infecciones. Se utilizó una jeringa estéril de 3mL por perro / por cada toma de muestra. En total, se obtuvieron un total de 215 muestras de 1 mL de sangre para la determinación de glucosa.

Para la prueba MER, se tomó una gota de sangre y se depositó en el espacio indicado para la lectura en la tira reactiva, el resultado obtenido a través del glucómetro se registró cinco segundos después del análisis.

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos a partir de la MER y los obtenidos a partir de la MQT. Para esto, se establecieron arbitrariamente distintos niveles de glucemia^{6,101-112,123}. Posteriormente con los resultados se realizaron los cálculos para establecer la diferencia numérica y en porcentaje entre cada método y se buscó un factor de corrección.^{101,123}

D. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS:

Se comprobó la inocuidad de los productos[®] utilizados, mediante la realización y comparación de los análisis de laboratorio (Hemograma –HG-, Química Sanguínea –QS-, Hemoglobina glucosilada –HgAc1-) al inicio y al final de cada tratamiento así como para el monitoreo al final del experimento, en los cuales se observó que no existen cambios significativos con respecto a los niveles normales establecidos para cada analito.

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas de QS, HG y HgAc1 de todos los tratamientos, así como de la curva inicial previa y posterior al estudio.

Los análisis fueron divididos de acuerdo a los analitos básicos para los perfiles hepático y renal (Tabla 6): ^{31,102,104}.

Tabla 6. Analitos que conforman los perfiles renal y hepático, para análisis bioquímico en perros

PERFIL HEPÁTICO		PERFIL RENAL	
Albúmina		Urea	
ALT		Creatinina	
FA		Albúmina	
TP		Fósforo	
Fósforo		Calcio	
Calcio		FA	
		ALT	
PERFIL HEPATO-RENAL			
Bicarbonato		Potasio	
Sodio		Cloro	

Los valores y niveles normales para cada analito, fueron proporcionados por el laboratorio de patología clínica de la FMVZ-UNAM (Tabla 7).

Tabla 7. Valores fisiológicos de los analitos de los perfiles renal y hepático, para análisis bioquímico en perros

PERFIL HEPÁTICO			
ALBUM	ALT	FA	TP
29-40	>70	>189	56-75

PERFIL RENAL					
UREA	CREATIN	P	Ca	FA	ALT
2.1-7.9	60-130	0.80-1.80	2.17-2.94	>189	>70

PERFIL HEPATO-RENAL			
BICARB	Na	K	Cl
17-25	141-152	3.8-5.4	108-117

X. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Discusión general:

La concentración de glucosa en sangre en los perros es un parámetro importante para indicar el estado de salud del paciente al ser examinado en la clínica de pequeñas especies, así como para prevenir y/o diagnosticar enfermedades como la DM o para la detección de la resistencia a la insulina que se llega a presentar en pacientes caninos con obesidad (que puede llevar al desarrollo posterior de DM)^{1-4,6,20,33,35}

Asimismo, se observa que existen problemas (por diversos factores) que pueden llegar a presentarse durante el tratamiento comúnmente dado para enfermedades como la DM en perros, lo que puede llevar a complicar la situación de mantener bajo control la enfermedad en el paciente que la padece, afectando así su calidad y tiempo de vida.³⁶⁻⁴⁵

También es de importancia mencionar que el médico veterinario requiere de poder contar con herramientas de diagnóstico y prevención que sean rápidas y confiables para poder tomar acciones oportunas y acertadas con respecto al protocolo a seguir cuando en la clínica se presente un paciente que presente signos de alteración en sus niveles de glucosa.¹⁰¹⁻¹¹²

Debido a todos los puntos anteriores, se considera de interés realizar un estudio donde se evalúen y comparen las concentraciones de glucosa en sangre en perros clínicamente sanos, con diferentes estados de condición corporal (ideal, sobrepeso, obesidad), bajo el uso de tratamientos alternativos tales como el gel de aloe (*Aloe barbadensis*) y el extracto de propóleo, que de acuerdo a la literatura (enfocada principalmente a la especie humana) poseen propiedades hipoglucemiantes, por lo que podrían ser de

utilidad para el tratamiento y/o prevención de la resistencia a la insulina y/o de la DM en perros.

Para una discusión de resultados más organizada, ésta se dividió en tres puntos principales que a continuación serán desglosados:

1. Validación de la prueba rápida de glucosa como método de monitoreo
2. Evaluación de los tratamientos administrados (gel de aloe, extracto de propóleo, control) sobre los niveles de glucosa en sangre en perros, para las tres etapas del estudio (1, 2 y 3)
3. Evaluación de la toxicidad aguda de cada uno de los tratamientos

1. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA RÁPIDA DE GLUCOSA COMO MÉTODO DE MONITOREO

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas rápidas de glucosa (glucómetro) y de las QS y HG de todos los tratamientos, incluyendo el grupo control (n=215). Para esto, se establecieron los distintos rangos de glucemia, tomando como referencia lo encontrado en la literatura^{6,31,40,101-112,123}. Posteriormente se realizaron los cálculos para establecer la diferencia entre cada grupo (tira reactiva ó prueba de laboratorio) así como su porcentaje. Posteriormente se aplicó un factor de corrección^{101,123}.(Tabla 8) De acuerdo a estos resultados y al análisis estadístico realizado (Tabla 8, Figuras 14 y 15) se observó que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos con ambas técnicas de análisis, por lo que se pudo comprobar que el uso de la prueba rápida de medición de glucosa en sangre con tiras reactivas es un método válido para llevar a cabo el monitoreo de los pacientes en las distintas etapas del proyecto¹²², por lo que puede ser utilizado para los pacientes tratados por médicos veterinarios dedicados a la clínica de pequeñas especies con toda seguridad.

Entre las pruebas de validación parcial de la prueba MER se comprobó que en el blanco de reactivo no existió ningún pico interferente en el tiempo de absorción máxima de la glucosa, también se realizó la linealidad y sensibilidad, con un valor de la pendiente comprendido en el intervalo para glucosa de 0.02 a 0.08 y con un valor para R² de ≥ 0.98 .¹²³

La eficacia del método se comprobó a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra enriquecida en el límite de decisión de la sustancia. El criterio de aceptación, se aceptó como correcta una exactitud comprendida en el intervalo de (80-120%) y un coeficiente de variación de <3%. La precisión de los resultados obtenidos del control de la eficacia del método se utilizó para realizar un control de la precisión del método cada 4 secuencias de trabajo. La validación *in vitro* se llevó a cabo mediante la medición de la absorbancia del estándar de glucosa diluida en cuatro concentraciones por medio del espectrofotómetro UV visible, se comprobó una sensibilidad mayor al 95% para la detección de la Glucosa y una buena reproducibilidad (figura 14). A través del método GAGO 20, Sigma-Aldrich®)^{122,123} y de acuerdo a las recomendaciones de validación del Colegio QFB México ^{124,125} para llevar a cabo la reproducibilidad y sensibilidad de un método. Con un total de 10 curvas instrumentales realizadas por operadores diferentes y en distintos días, se determinaron los intervalos de aceptación de la pendiente y de la ordenada en el origen para el analito. Las exactitudes medias obtenidas para el analito en todos los niveles de concentración, así como la reproducibilidad intralaboratorio (medida como coeficiente de variación) cumplen con los requisitos de validación del AOAC^{126,127}. La comprobación de que este método es apto para el uso previsto, control cuantitativo de la glucosa, se realizó mediante la comparación, obteniendo una valoración satisfactoria en todas las comparaciones con los valores asignados dentro del nivel de concentración de la curva de calibrado del método.¹²²⁻¹²³

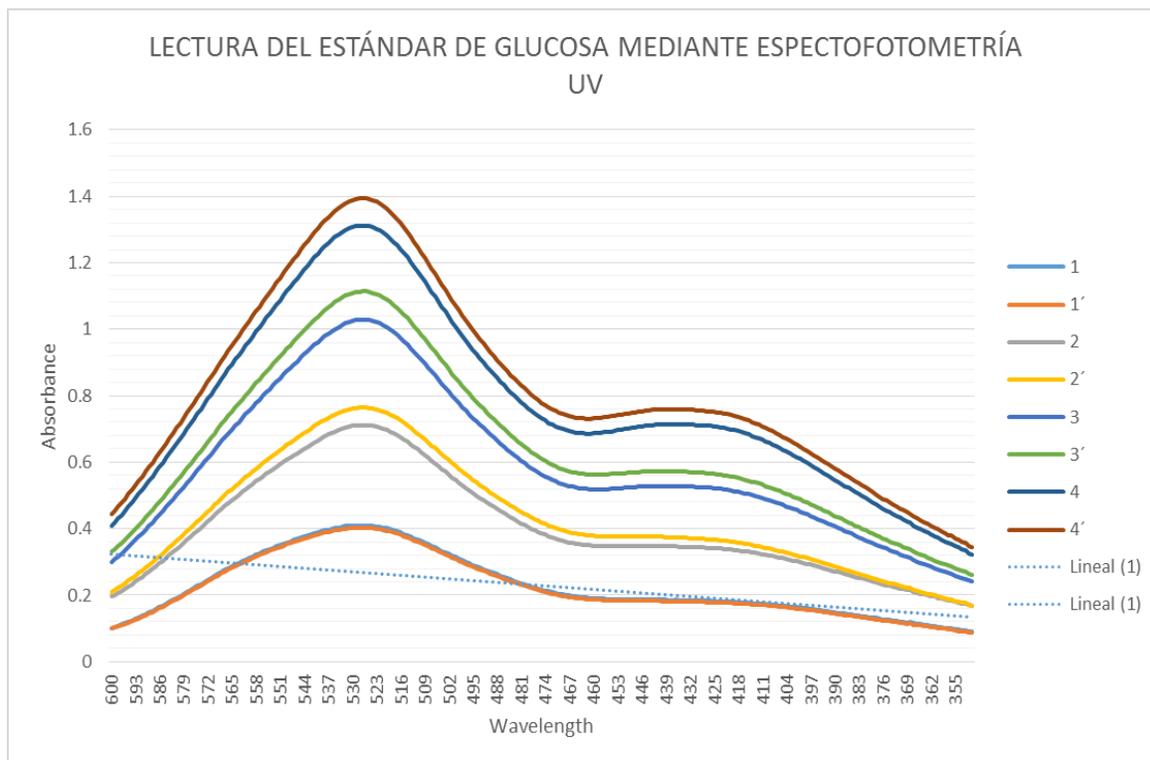


Figura 14. Lectura del Estándar de Glucosa, mediante un espectofotómetro UV visible, después de realizar 4 diluciones del estándar (STD) de glucosa por duplicado. (A: 1 y 1' correspondiente a la concentración de 0.02 mL de STD; B: 2 y 2' concentración de 0.04 mL de STD; C: 3 y 3' concentración de 0.06 mL de STD; D: 4 y 4' concentración de 0.08 mL de STD)^{16,122,123}

Tabla 8. Resumen estadístico de la comparación de los dos métodos para la medición de glucosa. Los valores obtenidos de cada método corresponden al promedio de las diferencias desviación estándar. Análisis de Varianza (ANOVA) $p= 0.057$ ¹²³

VALORES DE GLUCEMIA OBTENIDOS CON EL MÉTODO RÁPIDO (RT) Y EL MÉTODO QUÍMICO TRADICIONAL (CHT) (mg/dL)								
Niveles de glucosa en sangre	N	Valores (RT)	DE ±	Valores (CHT)	DE ±	Diferencia entre métodos	Porcentaje de diferencia %	Factor de corrección
50-80	12	75.0	1.95	71.2	4.5	3.8	5	-3.8
80-100	62	90.0	2.41	93.6	0.8	3.6	3.8	-3.6
100-120	72	109.8	0.35	109.3	0.81	0.5	0.4	-0.5
120-150	52	124.9	2.82	130.4	1.2	1.0	0.8	X 1.08
150-210	17	164.7	6.66	178.8	24.1	14.1	7.9	X 1.08

De acuerdo a los resultados obtenidos con ambas técnicas de medición de glucosa (MQT y MER) y al análisis estadístico (ANOVA) realizado (Tabla 8, Figura 15) se observó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.057$) entre los valores obtenidos con ambas técnicas de análisis¹²³.

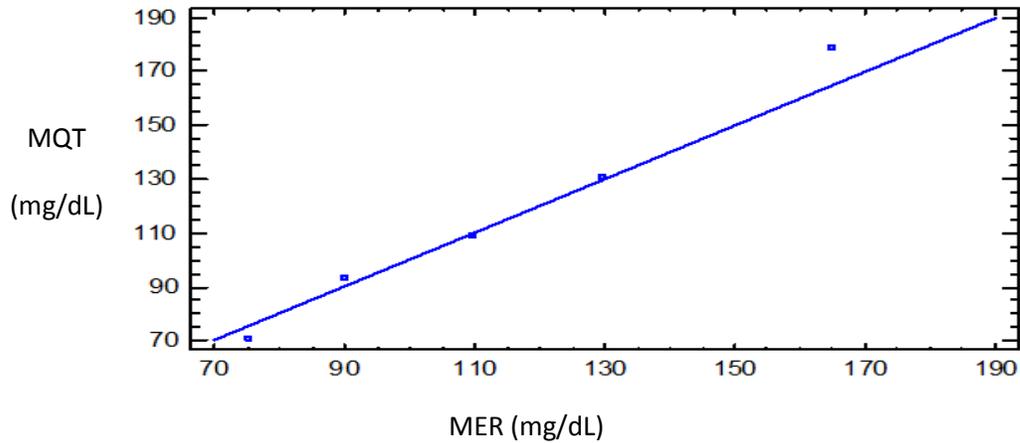
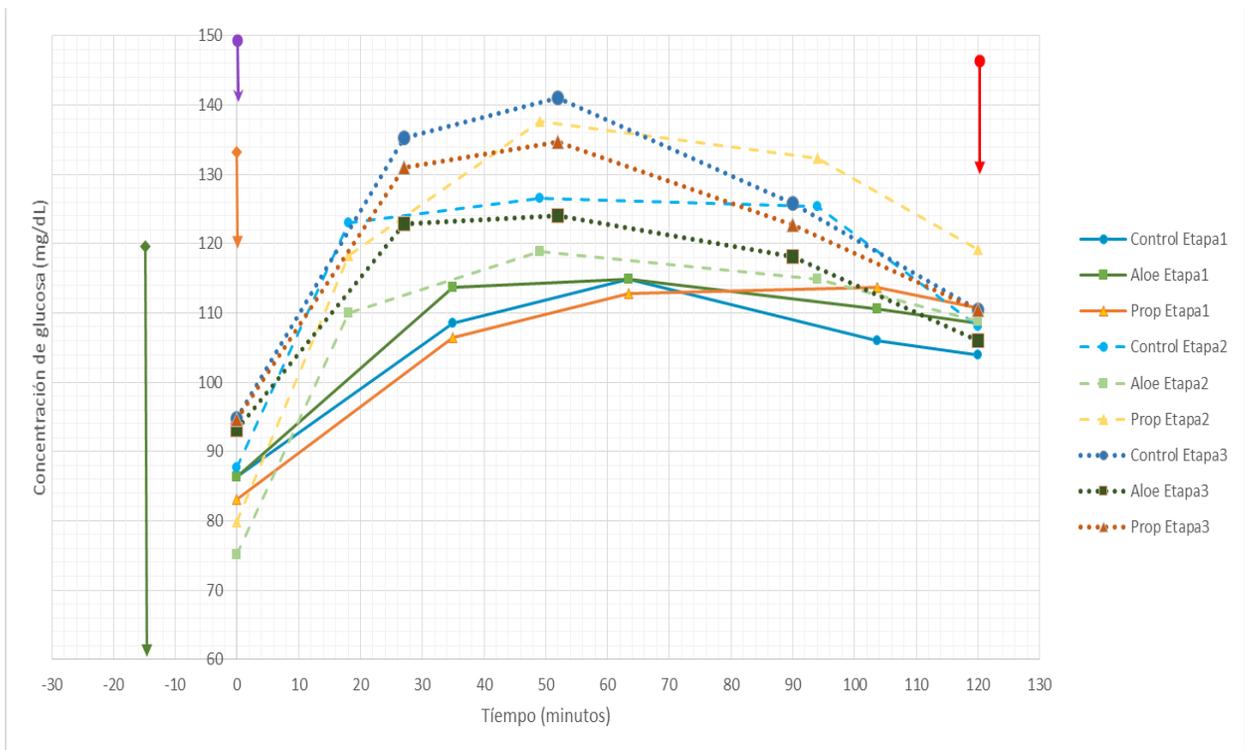


Figura 15. Comparación de medias de los dos métodos de monitoreo de Glucosa (MQT y MER).

Con la comparación de las dos pruebas realizadas para el analito, se corroboró la validez de la prueba rápida de medición de glucosa en sangre con tiras reactivas y glucómetro, como un método adecuado y confiable al que se puede recurrir en lugar del análisis por química sanguínea (MQT). Asimismo se comprueba su uso como una herramienta útil, confiable, rápida, económica y de fácil uso para el diagnóstico y monitoreo de los niveles de glucosa de los pacientes que son atendidos en el ejercicio diario del médico veterinario dedicado a pequeñas especies¹²³.

2. EVALUACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS (gel de Aloe, extracto de propóleo, control) SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE EN PERROS, EN LAS TRES ETAPAS DEL ESTUDIO (1, 2 y 3)

A continuación se presentan las gráficas con los resultados obtenidos de los niveles promedio de concentraciones de glucosa en sangre (mg/dL) correspondientes a cada tratamiento administrado (Control, Aloe, Propóleo) para cada etapa del estudio, mediante la prueba de lectura rápida de medición de glucosa con tiras reactivas:



CÓDIGO:

n=8
MAX= 141
min= 75

Rango normal [glucosa en sangre] en perros (ayuno) según literatura (75-120 mg/dl)

Rango normal [glucosa en sangre] en perros (posterior a ingesta de alimento) según literatura (120-180 mg/dl)

● → Administración bolo glucosa

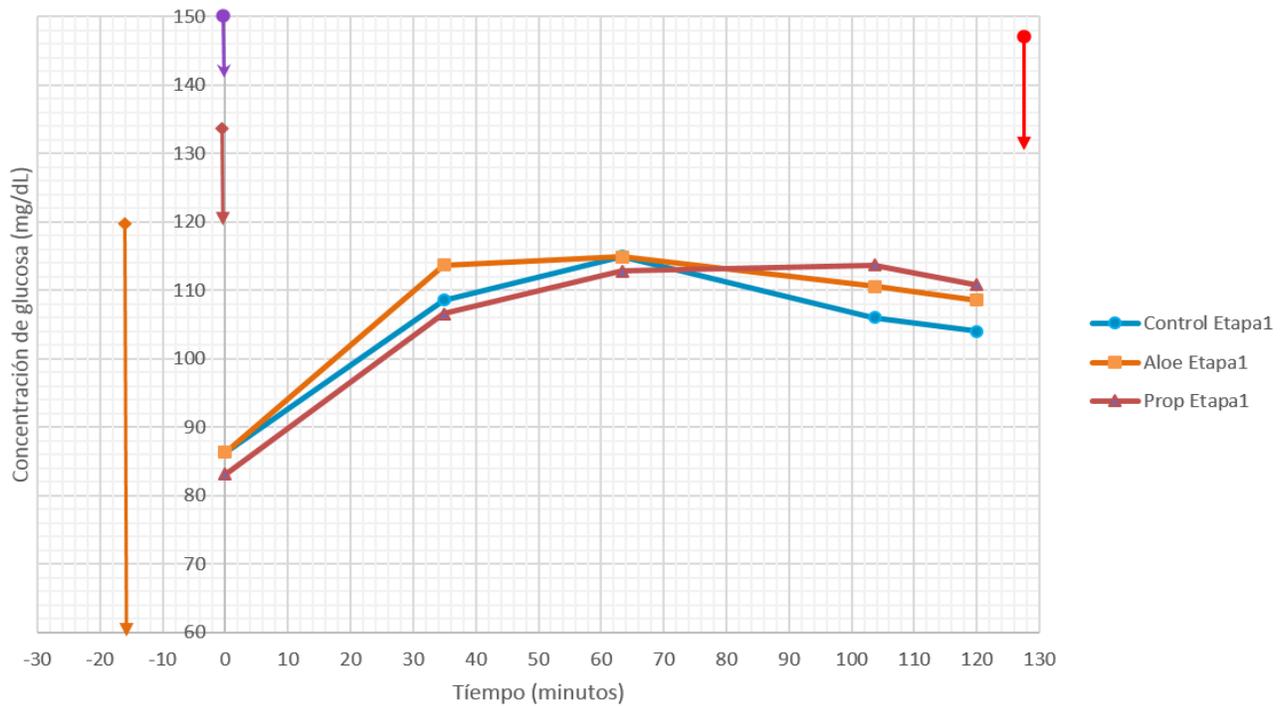
● → Administración Propóleo PO

● → Final de registro curva

● → Administración de Aloe PO

● → Control

Figura 16.1 NIVELES PROMEDIO DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) DE TODOS LOS TRATAMIENTOS (Control, Aloe, Propóleo) DE TODAS LAS ETAPAS (Etapas 1-3), MEDIANTE PRUEBA DE LECTURA RÁPIDA DE MEDICIÓN DE GLUCOSA CON TIRAS REACTIVAS Y GLUCÓMETRO



CÓDIGO:

n=8
MAX= 141
min= 75

Rango normal [glucosa en sangre] en perros (ayuno) según literatura (75-120 mg/dl)

Rango normal [glucosa en sangre] en perros (posterior a ingesta de alimento) según literatura (120-180 mg/dl)

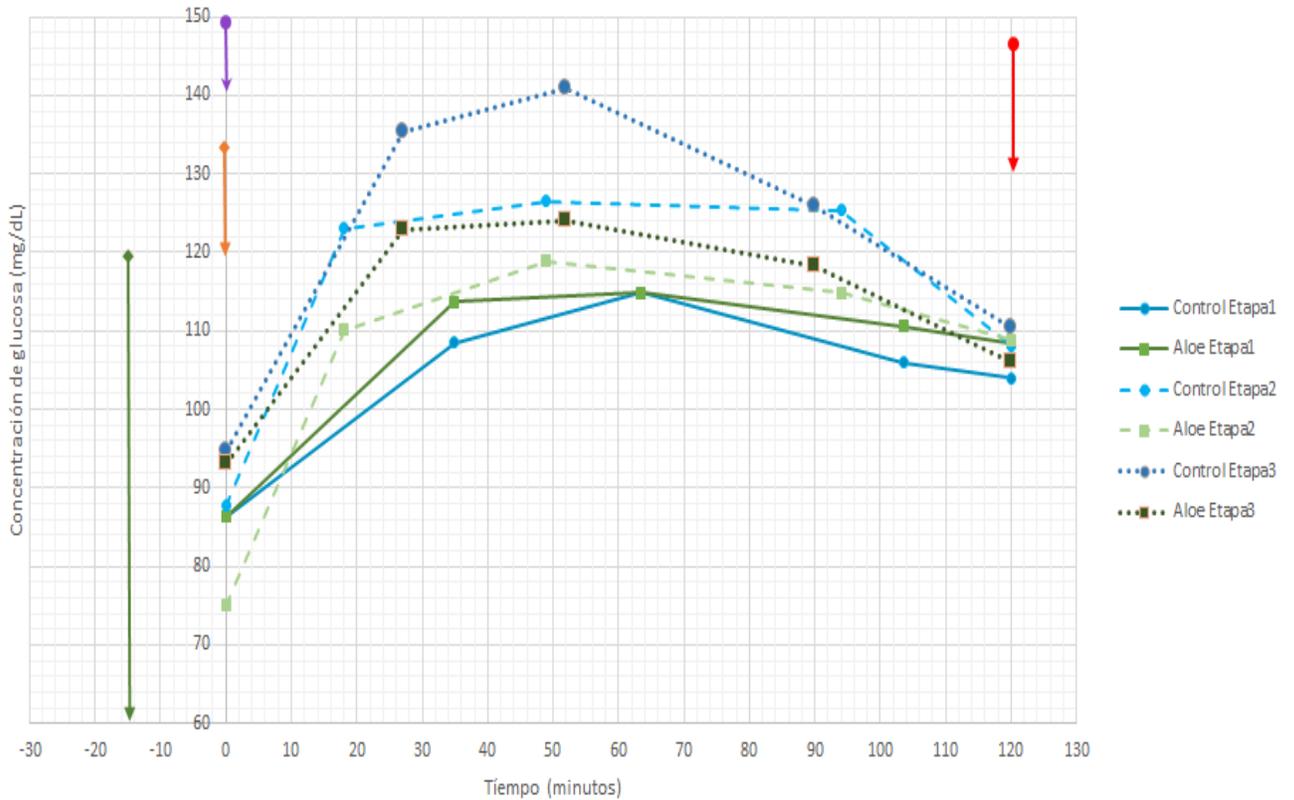
● → Administración bolo glucosa

● → Administración Propóleo PO

● → Final de registro curva

● → Administración de Aloe PO

Figura 16.2. NIVELES PROMEDIO DE CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) DE LA ETAPA 1, DE TODOS LOS TRATAMIENTOS (Control, Aloe, Propóleo), MEDIANTE PRUEBA DE LECTURA RÁPIDA DE MEDICIÓN DE GLUCOSA CON TIRAS



CÓDIGO:

n=8

MAX= 141

min= 75

Rango normal [glucosa en sangre] en perros (ayuno) según literatura (75-120 mg/dl)

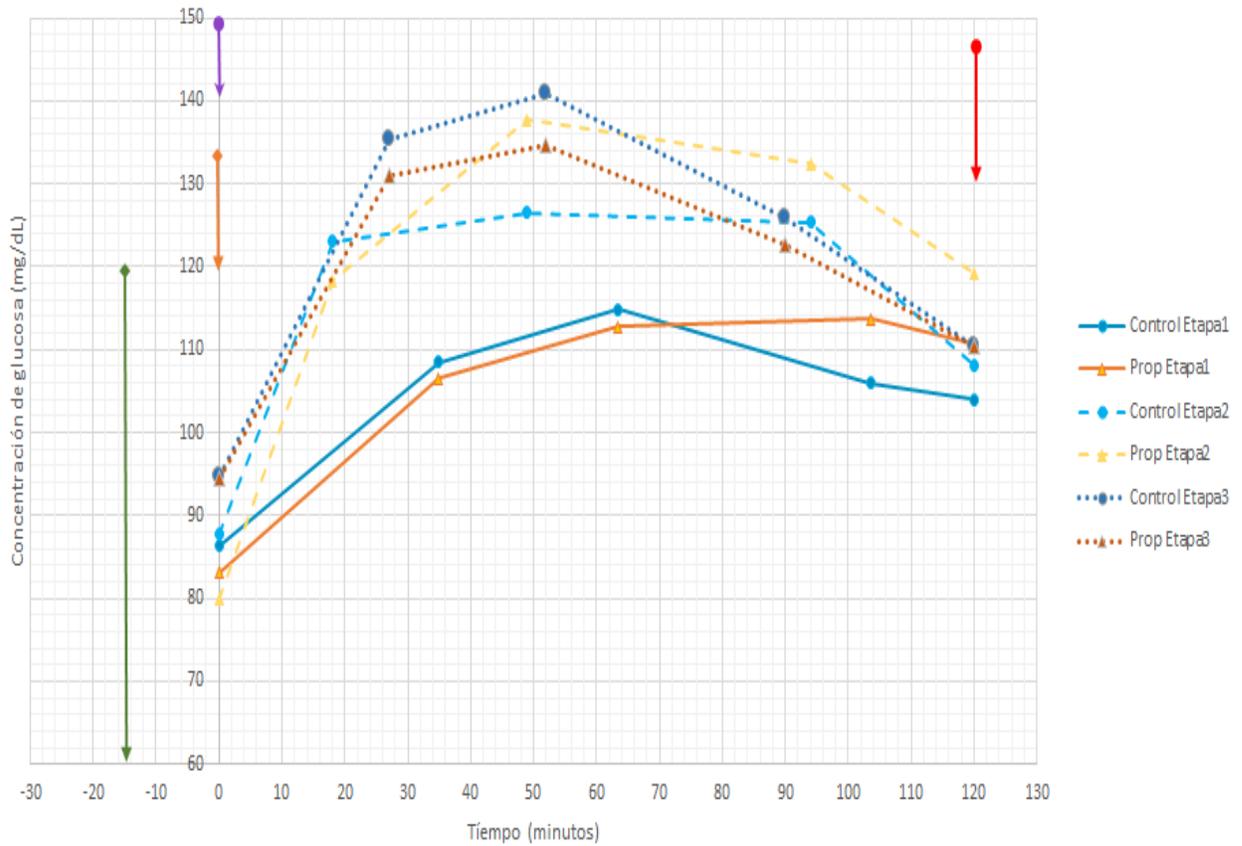
Rango normal [glucosa en sangre] en perros (posterior a ingesta de alimento) según literatura (120-180 mg/dl)

● → Administración bolo glucosa

● → Final de registro curva

● → Administración de Aloe PO

Figura 16.3. NIVELES PROMEDIO DE CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) DE TODAS LAS ETAPAS (Etapas 1-3), PARA CONTROL Y TRATAMIENTO CON Aloe Barbadensis®, MEDIANTE PRUEBA DE LECTURA RÁPIDA DE MEDICIÓN DE GLUCOSA CON TIRAS

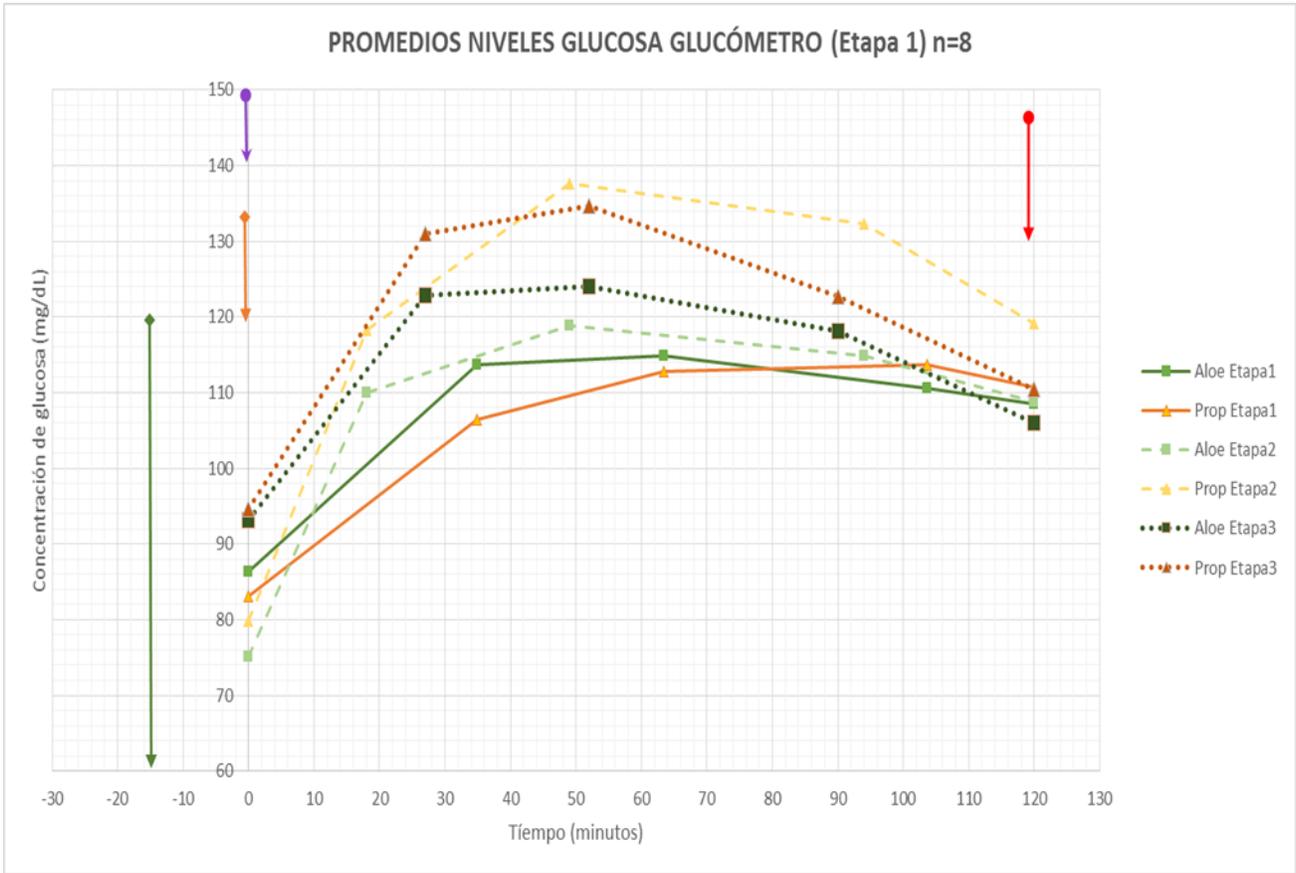


CÓDIGO:

n=8
MAX= 141
min= 75

- Rango normal [glucosa en sangre] en perros (ayuno) según literatura (75-120 mg/dl)
- Rango normal [glucosa en sangre] en perros (posterior a ingesta de alimento) según literatura (120-180 mg/dl)
- Administración bolo glucosa
- Administración Propóleo PO
- Final de registro curva

Figura 16.4. NIVELES PROMEDIO DE CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) DE TODAS LAS ETAPAS (Etapas 1-3), PARA CONTROL Y TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE PROPÓLEO®, MEDIANTE PRUEBA DE LECTURA RÁPIDA DE MEDICIÓN DE GLUCOSA CON TIRAS REACTIVAS Y GLUCÓMETRO



CÓDIGO:

n=8
MAX= 141
min= 75

- Rango normal [glucosa en sangre] en perros (ayuno) según literatura (75-120 mg/dl)
- Rango normal [glucosa en sangre] en perros (posterior a ingesta de alimento) según literatura (120-180 mg/dl)
- Administración bolo glucosa
- Administración Propóleo PO
- Final de registro curva
- Administración de Aloe PO
- Control

Figura 16.5. NIVELES PROMEDIO DE CONCENTRACIONES DE GLUCOSA EN SANGRE (mg/dL) DE TODAS LAS ETAPAS (Etapas 1-3), PARA LOS TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE PROPÓLEO ® Y GEL DE ALOE ®, MEDIANTE PRUEBA DE LECTURA RÁPIDA DE MEDICIÓN DE GLUCOSA CON TIRAS REACTIVAS Y GLUCÓMETRO

a. ETAPA 1 (perros clínicamente sanos, considerados en peso ideal):

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas rápidas de medición de glucosa con tiras reactivas con glucómetro y de las BQ de todos los tratamientos.

RESULTADOS:

- i. De acuerdo a la valoración Bioquímica se observó que 15 minutos después de administrar el bolo de glucosa y el extracto de propóleo, existió una ligera disminución en la glucemia con respecto al grupo control y el grupo tratado con gel de *Aloe barbadensis*[®]. Sin embargo ésta disminución no llegó a ser mucho mayor al finalizar el registro de la curva (a los 120 minutos). Asimismo, durante ésta primera etapa la concentración máxima de glucosa en sangre resultó similar en el caso de los tres tratamientos administrados, sin embargo ninguno de ellos se elevó más allá de los parámetros fisiológicos establecidos de acuerdo a la literatura^{6,31,101}, para una glucemia en sangre posterior a la ingesta de alimento. Siguiendo lo anterior, no existió un efecto estadísticamente significativo a corto plazo para ninguno de los tratamientos evaluados, bajo las dosis y tiempos establecidos previamente para éste estudio. Todo lo anterior puede observarse en las figuras 16.1 y 16.2.
- ii. El valor que muestra el análisis de varianza fue de $p = 0.36$ ($p > 0.05$). Dicho valor demuestra que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con un nivel de 95.0% de confianza (Figura 17).

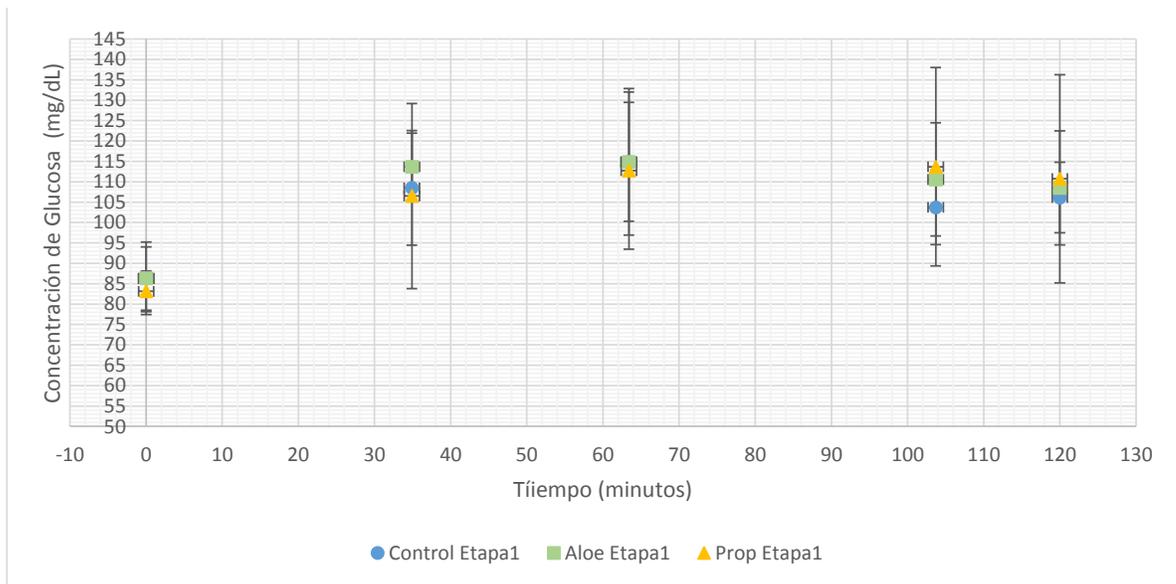


Figura 17. Análisis estadístico de la etapa 1 (ANOVA) $p = 0.36$

DISCUSIÓN:

De acuerdo a los resultados obtenidos para ésta primera etapa del estudio, en los perros clínicamente sanos y que se encuentran en una CC considerada como ideal, no se observa ningún cambio sobre la curva de concentración de glucosa en sangre, que resulte significativamente diferente con respecto al efecto fisiológico de la insulina del propio individuo, tanto en el caso del tratamiento con gel de aloe como en el caso del tratamiento con extracto de propóleo. Estos resultados concuerdan con respecto a lo encontrado en la literatura^{53,54,-59, 68-81}. Sin embargo, esto no significa necesariamente que ninguno de los tratamientos administrados poseen efectos que favorezcan la disminución de la concentración de glucosa en sangre. En éste caso se atribuye el no observar ningún cambio significativo, a que en los individuos sanos y en condición

corporal ideal y a que el páncreas funciona de modo adecuado, por lo que la actividad de la insulina es suficiente para mantener el control de la glucemia en el individuo^{20-30,32,35-44,104}.

Por otro lado, aunque no se observan efectos significativos para disminuir la concentración de glucosa en sangre de los perros, tanto el gel de aloe como el extracto de propóleo poseen otras cualidades como son sus efectos antioxidantes^{46,53,54,56,59,60,67,68-81}, que podrían igualmente ser útiles para ayudar a mantener al animal en un estado de salud adecuado, si se proporcionan como parte de un protocolo de medicina profiláctica.

b. ETAPA 2 (perros clínicamente sanos, considerados en sobrepeso):

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas rápidas de medición de glucosa con tiras reactivas con glucómetro y de las QS de todos los tratamientos.

Para ésta etapa no se consideró necesario llevar a cabo una evaluación completa de la toxicidad de los tratamientos ya que esto se realizó para la primera etapa. Sin embargo se realizaron pruebas de laboratorio (QS y Hemograma) al inicio y al final de cada curva de cada tratamiento administrado así como al inicio, durante y al final del estudio.

RESULTADOS:

- i. Después de la valoración bioquímica se observó que existía una diferencia entre la curva control de la etapa 1 post administración del bolo de glucosa, con respecto a la curva control de la etapa 2, pues los valores registrados para la curva control de la etapa 2 fueron más elevados que los de la etapa 1, sin embargo no salieron del nivel establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento^{6,31,101}. Esto puede observarse en la figura 16.1.
- ii. Se observó que existía una similitud de los valores entre las curvas para el tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] tanto de la etapa 1 como de la etapa 2, lo que muestra un efecto de disminución de la glucemia, con respecto al grupo control en ambas etapas, manteniéndose ambas curvas registradas para el tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] dentro del nivel establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en las figuras 16.1 y 16.3.

iii. Se observó una diferencia marcada entre los valores de las curvas para el tratamiento con extracto de propóleo® para las etapas 1 y 2, tanto entre ellas como en contraste con el grupo control, siendo los valores para el tratamiento con extracto de propóleo® de la etapa 2 los más elevados con respecto al grupo control de ambas etapas y al grupo tratado con extracto de propóleo® de la etapa 1, pero aún con esto los valores de las curvas del tratamiento con extracto de propóleo® para ambas etapas se encontraron dentro del nivel establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en las figuras 16.1 y 16.4.

iv. Con respecto al tratamiento con *Aloe barbadensis*® comparado con el de extracto de propóleo®, se observó que existía una diferencia entre ellas, para ambas etapas. Clínicamente se observó que durante la etapa 1 las concentraciones máximas de glucosa en sangre registradas para ambos tratamientos era similar, pero no comparados con las concentraciones de glucosa en sangre durante la etapa 2, donde primero, las curvas de los dos tratamientos administrados eran más elevadas que sus correspondientes en la etapa 1 y segundo, durante la etapa 2, los valores de las curvas para el tratamiento con extracto de propóleo® se apreciaron mucho más elevados que los registrados para el tratamiento con *Aloe barbadensis*®. Sin embargo y aún con esa diferencia que se observó entre ambos tratamientos durante la etapa 2, los valores de las curvas se encontraron dentro del nivel establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en las figuras 16.1 y 16.5.

iii. Entonces, para la etapa 2, con base a los resultados obtenidos durante éste estudio, a la valoración bioquímica se observó que a corto plazo, a una dosis única de 445

mg/kg de *Aloe barbadensis*[®] existió un efecto de disminución del 5.6% en los niveles de glucosa con respecto a los obtenidos para el grupo control y del 13.77 % con respecto al grupo tratado con extracto de propóleo[®]. Esto puede observarse en las figuras 16.1, 16.3, 16.4 y 16.5.

iv. El valor que muestra el análisis de varianza fue de $p= 0.014$ ($p = <0.05$). Dicho valor demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos administrados (*Aloe barbadensis*[®] y extracto de propóleo[®]), con un nivel de 95.0% de confianza (figura 18).

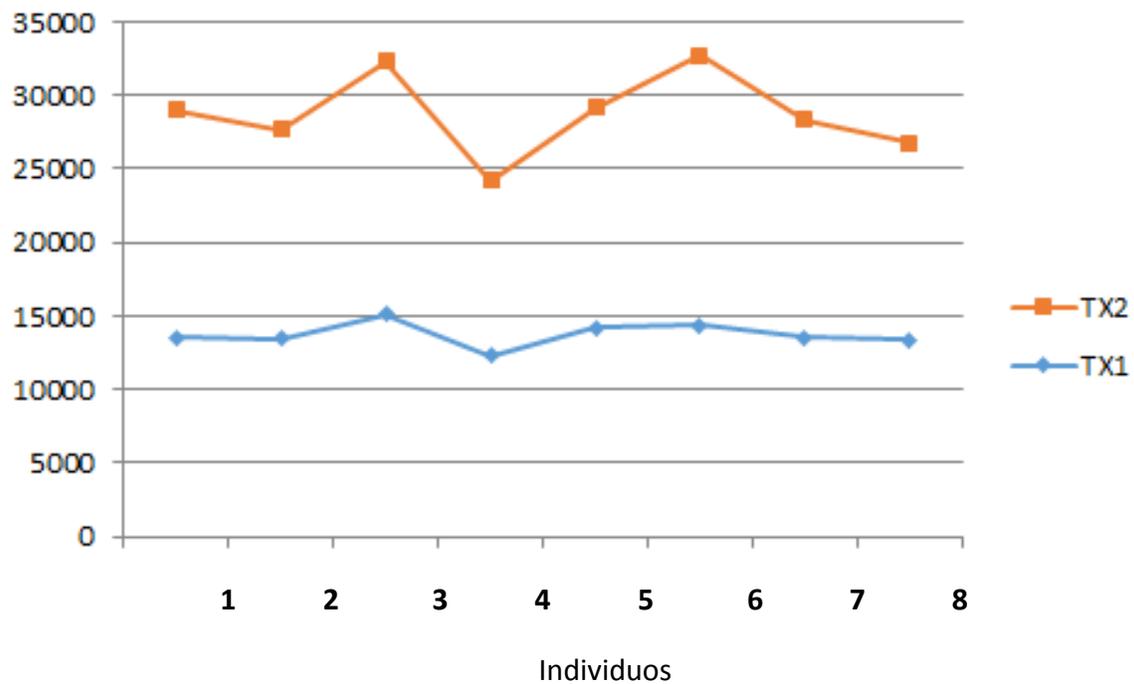


Figura 18. Análisis estadístico de la etapa 2 (ANOVA) $p = 0.014$

DISCUSIÓN:

De acuerdo a los resultados obtenidos para la segunda etapa del estudio, en los perros clínicamente sanos y que se encuentran en una CC considerada como sobrepeso, los valores de la curva control de concentración de glucosa en sangre fueron más elevados con respecto a los valores de la curva control para los perros de la etapa 1 del estudio (clínicamente sanos, considerados en CC ideal). Esto podría indicar una incipiente falla en el funcionamiento del páncreas de los individuos y por lo tanto, de la actividad de la insulina^{20-30,32,35-44,104}.

Con respecto al tratamiento con extracto de propóleo, se observó que no existe un cambio sobre la curva de concentración de glucosa en sangre, que resulte significativamente diferente con respecto al efecto fisiológico de la insulina del propio individuo. Estos resultados concuerdan con respecto a lo encontrado en la literatura⁶⁸⁻⁸¹. Sin embargo, esto no significa necesariamente que el extracto de propóleo no posee efectos que favorezcan la disminución de la concentración de glucosa en sangre. En éste caso se puede atribuir el no observar ningún cambio significativo, a que a pesar de que de acuerdo a la curva control de los perros en ésta etapa del estudio podría existir una incipiente falla en la función pancreática^{20-30,32,35-44,104}, el mecanismo de acción del extracto de propóleo es a nivel celular, sobre la enzima Akt/PKB de la vía de activación de insulina. En éste punto es donde el CAPE acelera la fosforilación de la Akt de forma tiempo-dependiente (pasando de un pico máximo de fosforilación de 1 hora a un pico máximo de fosforilación de 3 minutos), estimulando con mayor velocidad a los receptores Glut-4 y mejorando así una mayor entrada de glucosa al interior celular (Figura 12). Por lo tanto, para que la eficiencia de ésta vía de señalización celular sea

palpable, se requiere de un protocolo con dosis a largo plazo (mínimo de un mes) para poder observar su efecto sobre la disminución de la concentración de glucosa en sangre del individuo.⁶⁸⁻⁸¹

En el caso del tratamiento con gel de aloe, se observó que existe una diferencia significativa en la disminución de la concentración de glucosa en sangre, con respecto al grupo control y al del grupo tratado con el extracto de propóleo. Este resultado se puede atribuir a que el mecanismo de acción del gel de aloe es nivel intestinal, donde el aloe-emodin, por gradiente de concentración, se une a las α -glucosidasas, compitiendo así con la glucosa por esa unión, retrasando el paso de esta última al torrente sanguíneo y de ahí a los órganos (Figura 10), por lo que es posible observar su efecto sobre los niveles de glucosa en sangre a corto plazo. Sin embargo se sugiere un estudio donde se siga un protocolo con dosis a largo plazo (mínimo un mes) para corroborar lo descrito en la literatura con respecto a la efectividad y los beneficios en la salud del individuo, al dar el tratamiento con gel de aloe, tanto a corto como a largo plazo^{53,54,-59}.

c. ETAPA 3 (perros obesos, clínicamente sanos):

Se realizó la comparación de los resultados obtenidos a partir de las pruebas rápidas de medición de glucosa con tiras reactivas con glucómetro y de las QS de todos los tratamientos.

Para ésta etapa no se consideró necesario llevar a cabo una evaluación completa de la toxicidad de los tratamientos ya que esto se realizó para la primera etapa. Sin embargo se realizaron pruebas de laboratorio (QS y Hemograma) al inicio y al final de cada curva de cada tratamiento administrado así como al inicio, durante y al final del estudio.

RESULTADOS:

- i. A la valoración bioquímica se observó que existía una diferencia entre las curvas control para las tres etapas, post administración del bolo de glucosa, siendo los valores de la curva para la etapa 3 los más elevados. Sin embargo ninguno de los valores de las curvas para los controles de las tres etapas salieron del rango establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en la figura 16.1.
- ii. Bioquímicamente se observó que existía una similitud de los valores entre las curvas para el tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] para las etapas 1,2 y 3 de éste estudio, lo que se traduce en la observación de un efecto de disminución de la glucemia, con respecto a los grupos control en todas etapas, manteniéndose las tres curvas registradas para el tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] dentro del rango

establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en las figuras 16.1 y 16.3.

iii. Se observó una diferencia marcada entre los valores de las curvas para el tratamiento con extracto de propóleo[®] para las etapas 1, 2 y 3 de éste estudio, tanto entre ellas como en contraste con el grupo control, siendo los valores para el tratamiento con extracto de propóleo[®] de la etapa 2 los más elevados con respecto a los grupos control de las tres etapas y a los grupos tratados con extracto de propóleo[®] de las etapas 1 y 3 (que entre ellas se aprecian curvas similares), pero aún con esto los valores de las curvas del tratamiento con extracto de propóleo[®] para todas las etapas se encuentran dentro del rango establecido como fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en las figuras 16.1 y 16.4.

iv. Con respecto al tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] comparado con el de extracto de propóleo[®], se observó que existía una diferencia entre ellas, para las tres etapas. Bioquímicamente se observó que durante la etapa 1 las concentraciones máximas de glucosa en sangre registradas para los dos tratamientos era similar, pero no comparados con las concentraciones de glucosa en sangre durante las etapas 2 y 3, donde primero, las curvas de los dos tratamientos administrados durante las etapas 2 y 3 fueron más elevadas que sus correspondientes en la etapa 1 y segundo, durante las etapas 2 y 3, los valores de las curvas para el tratamiento con extracto de propóleo[®] se apreciaron mucho más elevados que los registrados para el tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] en éstas mismas etapas. Sin embargo y aún con esa diferencia que se observó entre ambos tratamientos durante las etapas 2 y 3, los valores de las curvas se encontraron dentro del nivel establecido como

fisiológico posterior a la ingesta de alimento, de acuerdo a la literatura^{6,31,101}. Esto puede observarse en las figuras 16.1 y 16.5.

v. Para la etapa 3, con base a los resultados obtenidos durante éste estudio, se observó que a corto plazo, a una dosis única de 445 mg/kg de *Aloe barbadensis*[®] existió un efecto de disminución del 12.1% en los niveles de glucosa con respecto a los obtenidos para el grupo control y del 7.46% con respecto al grupo tratado con extracto de propóleo[®]. Esto puede observarse en las figura 16.1, 16.3, 16.4 y 16.5.

vi. El valor que muestra el análisis de varianza fue de $p = 0.034$ ($p < 0.05$). Dicho valor demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del tratamiento con *Aloe barbadensis*[®] y el grupo control, con un nivel de 95.0% de confianza (figura 19).

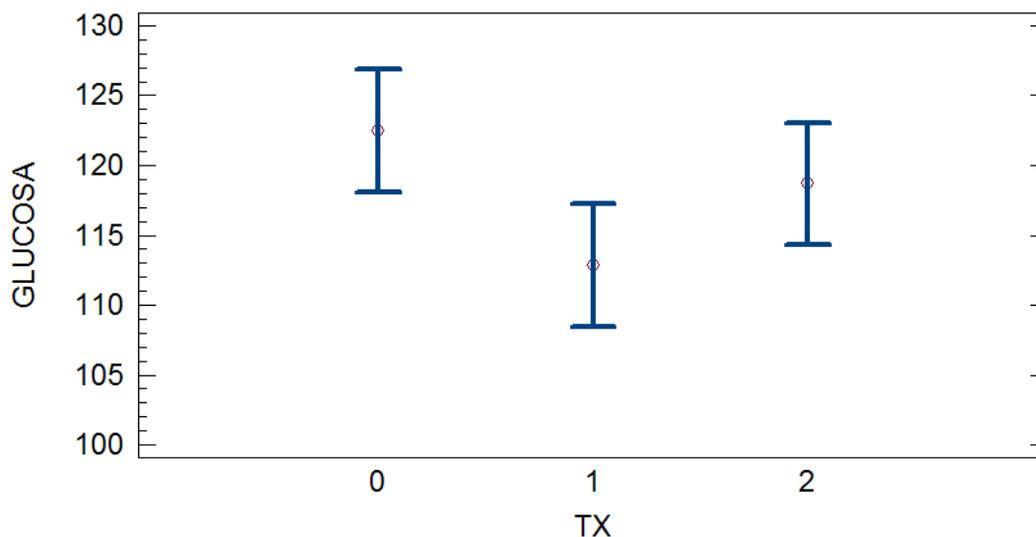


Figura 19. Análisis estadístico de la etapa 3 (ANOVA) $p = 0.034$

DISCUSIÓN:

De acuerdo a los resultados obtenidos para la tercera etapa del estudio, en los perros clínicamente sanos y que se encuentran en una CC considerada como obesidad, los valores de la curva control de concentración de glucosa en sangre fueron más elevados con respecto a los valores de la curva control para los perros de las etapas 1 y 2 del estudio (clínicamente sanos considerados en CC ideal y clínicamente sanos considerados en CC de sobrepeso, respectivamente). Esto podría indicar una falla en el funcionamiento del páncreas de los individuos y por lo tanto, de la actividad de la insulina^{20-30,32,35-44,104}.

En el caso del tratamiento con gel de aloe, se observó que existe una diferencia significativa en la disminución de la concentración de glucosa en sangre, con respecto al grupo control y al del grupo tratado con el extracto de propóleo, tanto para las curvas de la etapa 3 como al compararlas con las curvas de las etapas 1 y 2. Este resultado se puede atribuir a que el mecanismo de acción del gel de aloe es nivel intestinal, donde el aloe-emodin, por gradiente de concentración, se une a las α -glucosidasas, compitiendo así con la glucosa por esa unión, retrasando el paso de esta última al torrente sanguíneo y de ahí a los órganos (Figura 10), por lo que es posible observar su efecto sobre los niveles de glucosa en sangre a corto plazo. Sin embargo se sugiere un estudio donde se siga un protocolo con dosis a largo plazo (mínimo un mes) para corroborar lo descrito en la literatura con respecto a la efectividad y los beneficios en la salud del individuo, al dar el tratamiento con gel de aloe, tanto a corto como a largo plazo^{53,54,-59}.

La marcada diferencia que se observa en la disminución de la concentración de glucosa en sangre de los perros tratados con aloe con respecto al grupo control para la etapa 3, así como respecto a las etapas 1 y 2, puede atribuirse a que, de acuerdo a la literatura, en los individuos con obesidad existe evidencia de una resistencia a la insulina asociada a su condición corporal^{20-30,32,35-44,104}, por lo que es en estos individuos donde se observa claramente tanto un nivel elevado de glucemia en sangre (grupo control) como un efecto manifiesto en la disminución en los niveles de glucosa en sangre al administrar el tratamiento con gel de aloe^{53,54,-59}.

Con respecto al tratamiento con extracto de propóleo, se observó que no existe un cambio sobre la curva de concentración de glucosa en sangre, que resulte significativamente diferente con respecto al efecto fisiológico de la insulina del propio individuo, considerando que al ser perros obesos, puede ya existir una falla en la actividad pancreática y por lo tanto de la insulina. Estos resultados concuerdan con respecto a lo encontrado en la literatura^{20-30,32,35-44,8-81,104}. Sin embargo, esto no significa necesariamente que el extracto de propóleo no posea efectos que favorezcan la disminución de la concentración de glucosa en sangre. En éste caso se puede atribuir el no observar ningún cambio significativo, a que a pesar de que de acuerdo a la curva control de los perros en ésta etapa del estudio podría existir una resistencia a la insulina así como un posible fallo en la función pancreática^{20-30,32,35-44,104}, el mecanismo de acción del extracto de propóleo es a nivel celular, sobre la enzima Akt/PKB de la vía de activación de insulina. En éste punto es donde el CAPE acelera la fosforilación de la Akt de forma tiempo-dependiente (pasando de un pico máximo de fosforilación de 1 hora a un pico máximo de fosforilación de 3 minutos), estimulando con mayor

velocidad a los receptores Glut-4 y mejorando así una mayor entrada de glucosa al interior celular (Figura 12). Por lo tanto, para que la eficiencia de ésta vía de señalización celular sea palpable, se requiere de un protocolo con dosis a largo plazo (mínimo de un mes) para poder observar su efecto sobre la disminución de la concentración de glucosa en sangre de los perros.⁶⁸⁻⁸¹

DISCUSIÓN CON RESPECTO AL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS DOS TRATAMIENTOS ADMINISTRADOS, A LO LARGO DEL PRESENTE ESTUDIO:

- a. Con respecto al *Aloe barbadensis*: De acuerdo a los resultados observados en las tres etapas del presente estudio, el mecanismo de acción a nivel intestinal consistente en la unión del aloe-emodin -por gradiente de concentración- a las α -glucosidasas, compitiendo así con la glucosa por esa unión y retrasando el paso de esta última al torrente sanguíneo y de ahí a los órganos, puede observarse desde la primera dosis administrada. Sin embargo, para poder observar su acción antioxidante que inhibe la lipoperoxidación y la glicosilación, aumentando la actividad de GPX y SOD y disminuyendo los niveles de hemoglobina glicosilada el tiempo de tratamiento debe ser de mínimo tres semanas.^{53,54,-59}
- b. Con respecto al extracto de propóleo: De acuerdo a los resultados observados en las tres etapas del presente estudio, se requiere de mínimo un mes de administración del tratamiento para observar todos sus efectos beneficiosos: sobre la enzima Akt/PKB de la vía de activación de insulina, gracias a que el CAPE acelera la fosforilación de la Akt de forma tiempo-dependiente (pasando de un pico máximo de fosforilación

de 1 hora a un pico máximo de fosforilación de 3 minutos), estimulando con mayor velocidad a los receptores Glut-4 y mejorando así una mayor entrada de glucosa al interior celular; disminuir significativamente niveles de NO y malondialdehído, que producen inflamación y producción de citoquinas que pueden llevar a apoptosis celular; reducir la expresión de genes RNA para factores tumorales TNF- α and IFN- γ en el cerebro que también provocan inflamación y apoptosis celular; su efecto antioxidante al aumentar el GPX reducido, disminuyendo la lipoperoxidación, la glicosilación y los niveles de TBARS⁶¹⁻⁶⁸

3. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS:

Tomando como referencia los valores y rangos fisiológicos normales de cada analito de acuerdo a los utilizados en el laboratorio de patología clínica de la FMVZ-UNAM, se pudo demostrar que los resultados obtenidos antes, durante y después de la administración de cada tratamiento de éste estudio, ningún valor se encontró fuera de los valores normales en pacientes clínicamente sanos¹¹⁹⁻¹²⁷, por lo que se observa que no existe manifestación de toxicidad aguda provocada por los tratamientos aplicados^{47,51,53,54,55-58,60,61-65,68-73,128}, corroborando así la inocuidad de cada uno (Tablas 9.1,9.2,10.1,10.2).

En cuanto al efecto sobre los niveles de hemoglobina glicosilada en sangre de perros, ninguno de los valores se encontró fuera del rango fisiológico esperado, de acuerdo a la literatura^{31,101}, por lo que se observa que no existe manifestación de toxicidad aguda provocada por los tratamientos aplicados^{47,51,53,54,55-58,60,61-65,68-73,128}, corroborando así la inocuidad de cada uno (Tablas 9.1,9.2,10.1,10.2).

Tabla 9.1. Pruebas de Toxicidad Aguda Inicio/Fin de Cada Tx (Prueba de BIOQUÍMICA SANGUÍNEA)

BIOQ.SANG.		CONTROL INICIO		CONTROL FINAL		ALOE INICIO		ALOE FINAL	
ANALITO	REFERENCIA	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST
Glucosa	75-120/180	96.2	8.216	116.7	10.414	86.3	14.183	120.4	38.799
HbAc1	4.0-7.52	4.5	0.617	4.6	0.637	4.2	0.661	4.5	0.708
	mg/dl	83.8	18.762	82.8	18.541	74.0	30.266	81	33.125
ALBUM	29-40	31.0	2.789	30.1	3.137	30.8	2.256	28.8	4.653
ALT	>70	45.6	14.615	44.5	14.128	44.9	17.022	42.0	19.310
FA	>189	112.1	52.895	115.0	50.555	121.3	40.938	112.8	44.933
TP	56-75	61.1	6.091	58.5	3.674	61.4	4.122	56.9	10.296
UREA	2.1-7.9	6.4	1.507	5.6	2.064	5.7	1.924	5.1	1.890
CREATIN	60-130	104.8	19.337	104.8	19.337	102.3	20.649	100.0	25.712
P	0.80-1.80	1.4	0.359	1.2	0.245	1.2	0.435	1.1	0.331
Ca	2.17-2.94	2.5	0.121	2.5	0.148	2.5	0.030	2.4	0.350
Na	141-152	145.3	3.113	148.9	7.432	144.5	1.753	146.5	2.659
K	3.8-5.4	4.3	0.375	4.0	0.274	4.3	0.373	4.1	0.119
Cl	108-117	113.8	3.092	114.5	3.850	112.1	2.957	114.6	3.389
BICARB	17-25	21.4	2.299	22.3	2.287	21.6	2.811	21.3	2.396

Tabla 9.2. Pruebas de Toxicidad Aguda Inicio/Fin de Cada Tx (Prueba de BIOQUÍMICA SANGUÍNEA)

BIOQ.SANG.		PROPOLEO INICIO		PROPOLEO FINAL		MONITOREO FINAL	
ANALITO	REFERENCIA	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST
Glucosa	75-120/180	92.3	11.603	115.0	24.864	96.1	8.274
HbAc1	4.0-7.52	4.4	0.349	4.6	0.364	4.7	0.650
	mg/dl	77.7	11.493	82.8	12.244	84.6	18.944
ALBUM	29-40	31.3	2.570	30.8	3.260	31.0	2.619
ALT	>70	48.5	18.600	46.6	16.392	45.5	13.825
FA	>189	112.6	55.293	108.0	50.421	112.3	53.125
TP	56-75	62.3	4.735	60.5	4.523	57.0	14.061
UREA	2.1-7.9	6.8	2.006	6.2	2.092	6.6	1.503
CREATIN	60-130	94.1	22.686	93.6	21.600	102.5	15.639
P	0.80-1.80	1.4	0.282	1.3	0.198	1.3	0.348
Ca	2.17-2.94	2.6	0.093	2.6	0.185	2.5	0.118
Na	141-152	145.5	3.846	146.5	4.017	145.4	3.159
K	3.8-5.4	4.3	0.400	4.1	0.216	4.3	0.369
Cl	108-117	113.3	3.644	114.8	3.369	113.3	3.552
BICARB	17-25	23.6	3.337	23.3	2.563	21.8	1.832

Tabla 10.1. Pruebas de Toxicidad Aguda Inicio/Fin de Cada Tx (Prueba de HEMOGRAMA)

HEMOGRAMA		CONTROL INICIO		CONTROL FINAL		ALOE INICIO		ALOE FINAL	
ANALITO	REFERENCIA	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST
Hematocrito	0.37-0.55	0.45	0.0389	0.40	0.035	0.41	0.035	0.47	0.041
Hemoglobina	120-180	158	17.9444	160.00	18.172	159.00	18.058	162.00	18.399
Eritrocitos	5.5-8.5	13.54	18.7801	9.01	12.503	8.70	12.069	8.00	11.098
VGM	60-77	66.38	1.6850	67.01	1.701	66.87	1.698	68.03	1.727
CGMH	320-360	350.50	14.1623	349.25	14.112	351.52	14.204	348.59	14.085
RETICULOCIT	<60	0.00	0.0000	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
PLAQUETAS	200-600	303.38	54.2269	301.25	53.847	303.58	54.264	304.25	54.383
SOLIDOS TOT	60-75	68.50	4.2426	68.54	4.245	69.54	4.307	67.12	4.157
LEUCOCITOS	6.0-17.0	9.68	1.4079	9.02	1.313	10.35	1.506	9.57	1.393
DIFERENCIAL									
NEUTROFILO	3.0-11.5	5.80	1.1148	5.69	1.094	5.25	1.009	6.04	1.161
BANDAS	<0.3	0.01	0.0354	0.02	0.057	0.05	0.141	0.01	0.028
METAMIELOC	0	0.00	0.0000	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
MIELOCITOS	0	0.00	0.0000	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
LINFOCITOS	1.0-4.8	2.45	0.7838	2.51	0.803	2.38	0.761	2.62	0.838
MONOCITOS	0.1-1.4	0.54	0.3204	0.56	0.334	0.50	0.298	0.53	0.316
EOSINOFILOS	0-0.9	0.75	0.3964	0.79	0.418	0.71	0.375	0.78	0.412
BASOFILOS	raros	0.13	0.1753	0.13	0.182	0.15	0.210	0.17	0.238

Tabla 10.2. Pruebas de Toxicidad Aguda Inicio/Fin de Cada Tx (Prueba de HEMOGRAMA)

HEMOGRAMA		PROPOLEO INICIO		PROPOLEO FINAL		MONITOREO FINAL	
ANALITO	REFERENCIA	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST	PROMEDIO	DESVEST
Hematocrito	0.37-0.55	0.43	0.037	0.45	0.039	0.44	0.038
Hemoglobina	120-180	161.00	18.285	164.00	18.626	169.00	19.194
Eritrocitos	5.5-8.5	8.90	12.347	8.60	11.930	8.40	11.653
VGM	60-77	66.58	1.690	68.25	1.733	67.64	1.717
CGMH	320-360	349.02	14.103	350.89	14.178	352.48	14.242
RETICULOCIT	<60	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
PLAQUETAS	200-600	303.57	54.262	301.96	53.974	303.54	54.256
SOLIDOS TOT	60-75	69.02	4.275	68.38	4.235	68.47	4.241
LEUCOCITOS	6.0-17.0	11.06	1.609	9.70	1.412	9.94	1.446
DIFERENCIAL							
NEUTROFILO	3.0-11.5	5.80	1.115	5.62	1.080	5.39	1.036
BANDAS	<0.3	0.01	0.028	0.02	0.057	0.03	0.085
METAMIELOC	0	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
MIELOCITOS	0	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000
LINFOCITOS	1.0-4.8	2.49	0.797	2.54	0.813	2.46	0.787
MONOCITOS	0.1-1.4	0.60	0.358	0.54	0.322	0.58	0.346
EOSINOFILOS	0-0.9	0.73	0.386	0.75	0.396	0.77	0.407
BASOFILOS	raros	0.11	0.154	0.12	0.168	0.19	0.266

XI. CONCLUSIONES:

De acuerdo a los resultados obtenidos en los perros con peso ideal clínicamente sanos (etapa 1), se observó que no existe efecto clínico estadísticamente significativo a corto plazo para ninguno de los dos tratamientos evaluados y tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos de la etapa 1.

Basado en los resultados obtenidos en los perros con sobrepeso clínicamente sanos (etapa 2), a la evaluación bioquímica se observó a corto plazo que una dosis única de 445 mg/kg de *Aloe barbadensis*[®] existe un efecto de reducción del 5.6% en los niveles de glucosa en sangre, con respecto a los obtenidos en el grupo control y del 13.77 % con respecto al grupo tratado con extracto de propóleo[®]. También se observó que con base a los resultados obtenidos, no existe efecto clínico estadístico significativo a corto plazo del propóleo líquido[®] ni para perros en peso ideal ni para perros con sobrepeso. Estadísticamente no existió diferencia significativa entre el grupo control con respecto a los tratamientos administrados, pero si entre el grupo tratado con *Aloe barbadensis*[®] y el tratado con extracto de propóleo[®] (p=0.014).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los perros con obesidad y clínicamente sanos (etapa 3), a corto plazo se observó que a una dosis única de 445 mg/kg de *Aloe barbadensis*[®] existe un efecto clínico de reducción del 12.1 % en los niveles de glucosa en sangre, con respecto a los obtenidos en el grupo control y del 7.46 % con respecto al grupo tratado con extracto de propóleo[®]. También se observó que con base a los resultados obtenidos, no existe efecto significativo a corto plazo del propóleo líquido[®] para ninguna de las tres etapas del presente estudio. Estadísticamente no existió diferencia significativa

entre el grupo control con respecto al tratamiento de extracto de propóleo[®] ni entre éste último con respecto al tratamiento con *Aloe barbadensis*[®], pero sí entre el grupo control y el grupo tratado con *Aloe barbadensis*[®] (p=0.034).

Con respecto a los niveles de hemoglobina glicosilada en sangre medidos durante la etapa 1 del presente estudio, ninguno de los valores se encontró fuera del rango establecido como fisiológico de acuerdo con la literatura.

De acuerdo a los puntos anteriores, sería recomendable aumentar el número de individuos en todas las etapas para obtener resultados más representativos, así como aumentar la dosis del producto comercial ó formular un extracto más concentrado de ambos productos para obtener mejores resultados. Asimismo sería recomendable realizar un tratamiento a largo plazo (mínimo de un mes), para observar de una mejor manera el efecto de cada uno de los tratamientos sobre los niveles de glucosa y de hemoglobina glicosilada en sangre en perros, midiendo al mismo tiempo los niveles de insulina liberados después de la administración de glucosa.

Derivado de la experimentación se corroboró la inocuidad de los productos de origen natural con propiedades hipoglucemiantes[®] utilizados, mediante la realización y comparación de los análisis de laboratorio (Hemograma, Bioquímica Sanguínea, Hemoglobina glicosilada) al inicio, durante y al final de cada tratamiento así como para el monitoreo al final de la etapa 1 del experimento, donde se observó que no existen cambios significativos con respecto a los rangos fisiológicos establecidos para cada analito de acuerdo a la literatura y por lo tanto, no se observó signo de toxicidad aguda.

Por otro lado, además de los efectos hipoglucemiantes que poseen tanto el gel de aloe como el extracto de propóleo, ambos poseen otras cualidades como son sus efectos antioxidantes, que podrían igualmente ser útiles para ayudar a mantener al animal en un estado de salud adecuado, si se proporcionan como parte de un protocolo de medicina profiláctica. De este modo no sólo se previene y/o ayuda al tratamiento de enfermedades como la DM, también proporcionan un beneficio preventivo para pacientes cuya función pancreática y condición corporal sean las adecuadas y en el caso de pacientes que presenten sobrepeso, les proporciona un beneficio para frenar o disminuir el avance del daño tisular promovido por su condición corporal y la dieta que llevan.

Mediante los análisis efectuados, tanto del estándar de glucosa *in vitro* (GAGO 20, Sigma-Aldrich®) como con la comparación de las pruebas realizadas para dicho analito (tiras reactivas + glucómetro V.S. pruebas de laboratorio) a partir de las muestras de la etapa 1 del estudio, se corroboró la validez de la prueba rápida de glucosa (glucómetro) como un método adecuado y confiable para el monitoreo de los pacientes de éste estudio. También se comprueba su uso como una herramienta útil, confiable, rápida, económica y de fácil uso para el diagnóstico y monitoreo de los niveles de glucosa de los pacientes que se presenten durante el ejercicio diario del médico veterinario dedicado a pequeñas especies (se observa una reducción de costos, de \$380 M.N. por un análisis de bioquímica de laboratorio, a diferencia del costo de \$10 M.N. por realizar una prueba rápida con glucómetro y tira reactiva).

XII. ANEXOS:

1. ESCALA DE CINCO PUNTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN CORPORAL EN PERROS ^{1-4,115,116}

ANOREXIA (1/5)

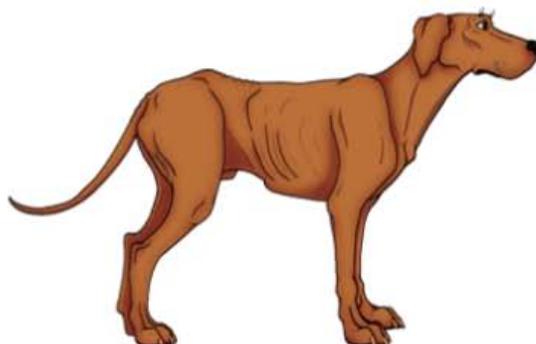
VISTA AÉREA

SE OBSERVA:

- Costillas, vértebras, escápulas y huesos pélvicos apreciables a simple vista
- Pérdida evidente de masa muscular
- Ausencia de grasa palpable sobre la caja torácica
- Cintura lumbar y concavidad abdominal marcadas



VISTA PERFIL

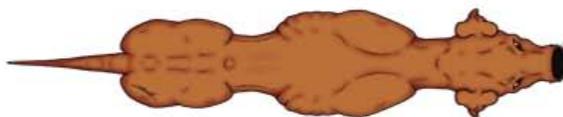


PESO BAJO (2/5)

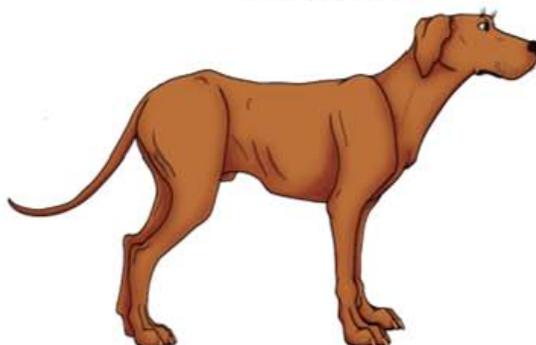
VISTA AÉREA

SE OBSERVA:

- Costillas, vértebras, escápulas y huesos pélvicos visibles
- Ligera cobertura superficial de grasa palpable sobre la caja torácica
- Visto dorsalmente, la cintura lumbar es evidente
- Visto lateralmente la concavidad abdominal es notable



VISTA PERFIL

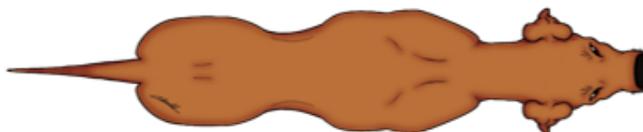


PUNTOS DE CONDICIÓN CORPORAL (CC) PESO IDEAL (3/5)

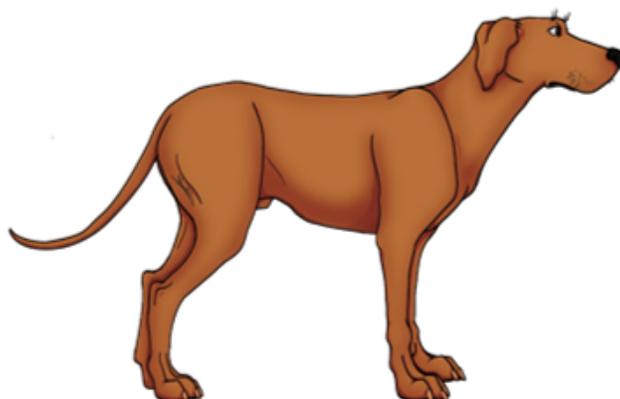
SE OBSERVA:

- Costillas, vértebras, escápulas y huesos pélvicos no visibles pero fácilmente palpables
- Delgada capa palpable de tejido adiposo sobre la caja torácica
- Contorno liso o cierto engrosamiento en la base de la cola
- Visto dorsalmente, cintura lumbar bien proporcionada
- Visto lateralmente, concavidad abdominal ligera

VISTA AÉREA



VISTA PERFIL

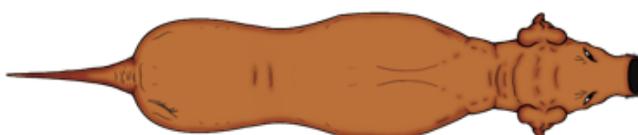


SOBREPESO (4/5)

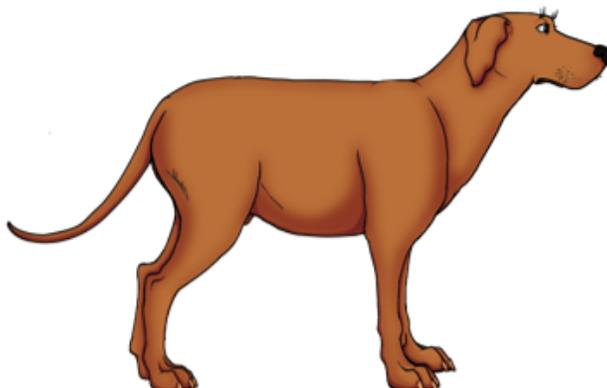
SE OBSERVA:

- Costillas, vértebras, escápulas y huesos pélvicos palpables con dificultad
- Depósito adiposo evidente sobre la columna vertebral y base de la cola
- Visto dorsalmente, cintura lumbar poco evidente
- Visto lateralmente, concavidad abdominal aparente ó escasa

VISTA AÉREA



VISTA PERFIL

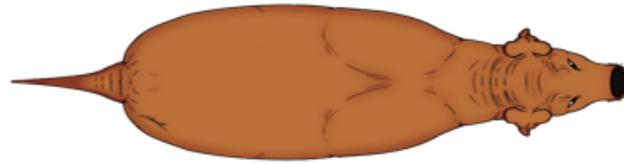


PUNTOS DE CONDICIÓN CORPORAL (CC) OBESIDAD (5/5)

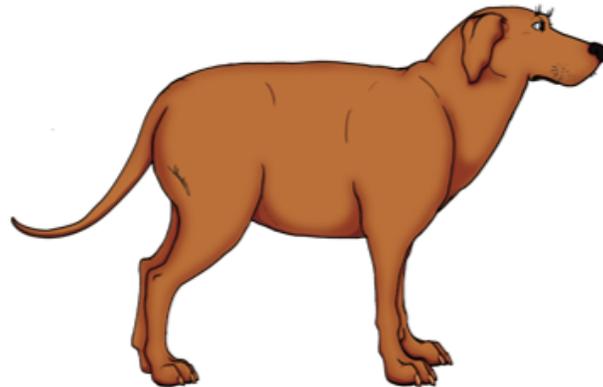
VISTA AÉREA

SE OBSERVA:

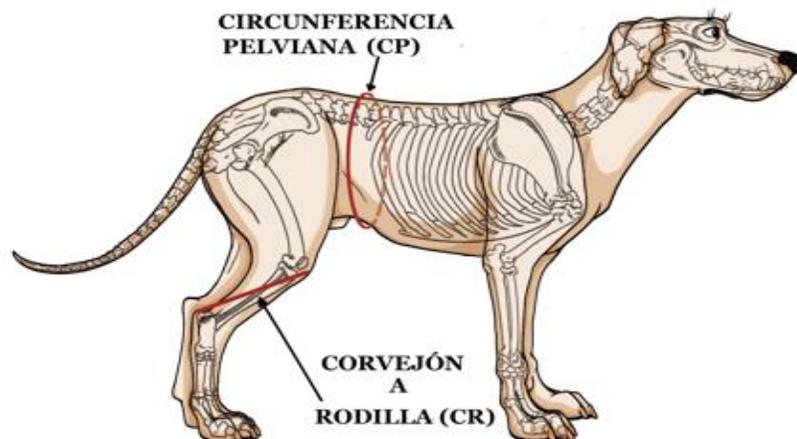
- Evidentes depósitos de grasa en el tórax, vértebras, abdomen y en la base de la cola
- Prominencias óseas difícilmente palpables, bajo una moderada a gruesa cobertura grasa
- Abultamiento ventral colgante, sin cintura ventral



VISTA PERFIL



2. DETERMINACIÓN DE GRASA CORPORAL (GC) FÓRMULAS MORFOMETRÍA



$$\begin{aligned}\%GC \text{ MACHOS} &= -1.4 (RT [\text{cm}]) + 0.77 (CP [\text{cm}]) + 4 \\ \%GC \text{ HEMBRAS} &= -1.7 (RT [\text{cm}]) + 0.93 (CP [\text{cm}]) + 5\end{aligned}$$

$$\text{Ambos sexos } \%GC = \frac{-0.0034 (RT [\text{cm}])^2 + 0.0027 (CP [\text{cm}])^2 - 1.9}{PC (\text{kg})}$$

3. EJEMPLO DE LOS CALCULOS REALIZADOS PARA DETERMINAR LOS REQUERIMIENTOS ENERGÉTICOS EN LOS PERROS Y LA CANTIDAD DEL ALIMENTO COMERCIAL PARA SATISFACER SUS NECESIDADES DE ENERGÍA, DE ACUERDO A LA LITERATURA^{1-4,115,116}

Alimento proporcionado: Nupec Óptimo Adulto

Peso del perro= 20Kg

1 taza de alimento Nupec Óptimo Adulto equivale a 103g (de acuerdo al empaque)

Tipo de actividad del perro= Activo

a. Determinar necesidades energéticas de acuerdo a la actividad del perro

NECESIDADES ENERGÉTICAS			
Nec. Energía: $(132)(20\text{kg})^{0.67} = (132)(7.68) = 1013.76 \text{ kcal EM/día}$			
296.01 kcal	por cada 100g alimento/día		
1013.76 kcal	x g alimento/día	x= 342.47g alimento/día	

EM/día = Energía Metabolizable al día

b. Determinar cuánto se requiere de alimento Nupec Óptimo Adulto al día para cubrir esas necesidades energéticas:

ANALITO	AN. GARANTIZADO (%)	AD WATERS	RESULTADO		
PC (min)	22	x 3.5	77		
EE (min)	8	x 8.5	68		
FC (max)	4	***	***		
Cen (max)	7.5	***	***		
Hum (max)	8	***	***		
E.L.N.	50.5	x 3.5	176.75		
			321.75	kcal/1000g día (B100)	
			296.01	kcal/1000g día (BHum)	

PC = Proteína Cruda

EE = Extracto Etéreo

FC = Fibra Cruda

Cen = Cenizas

Hum = Humedad

E.L.N. = Elementos

Libres de Nutrógeno

AN. GARANTIZADO =

Análisis Garantizado

min = mínimo

max = máximo

kcal = kilocalorías

B100 = Base 100

BHum = Base Húmeda

c. Determinar la equivalencia de las tazas totales al día:

1 taza NupOpAd = 255mL (103g)		
342.47g alimento/día para NEC. EN.		
Entonces		
103 g son 1 taza		
342.47 g son x tazas		
x= 3.3 tazas		

NupOpAd = Nupec Óptimo Adulto

**4. PUBLICACIÓN DEL ARTÍCULO CIENTÍFICO DERIVADO DE LA
ETAPA 1 DEL ESTUDIO**

**TRANSYLVANIAN
REVIEW**

VOL XXV, No. 23, 2017



Transylvanian Review

Centrul de Studii Transilvane | str. Mihail Kogalniceanu nr. 12-14, et.5, Cluj-Napoca

Email: transylvanianreview@gmail.com

Online Submission System: <http://transylvanianreviewjournal.org/>

Effectiveness of a Quick Validated Monitoring Method for Glucose Levels in Dog Blood Compared to the Traditional Chemical Method

¹ Claudia Karyna Alarcón Colín, ¹ Sara Del Carmen Caballero Chacón, ² Raquel Lopez Arellano, ¹ Luis Ocampo Camberos and ^{*1} Dinorah Vargas Estrada

¹Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico and ²Laboratory of Pharmaceutical Assays, Faculty of Higher Studies Cuautitlán. National Autonomous University of Mexico

Abstract

Background: The use of a rapid glucose measurement test (RT) with a glucometer and commercially available test strips was validated and its diagnostic value was compared with the traditional chemical test (CHT), to have a cheaper tool for prevention and the diagnosis of diseases related to the alteration of this monosaccharide in the veterinary clinic.

Materials and methods: 8 adult dogs were used that were more than one year old and were considered an ideal and clinically healthy weight according to the results of the physical examination and the cabinet tests. Blood samples were obtained to create a triplicate glucose curve for each dog and the glucose was evaluated using the two methods, already mentioned. Previously, in vitro validation of the RT test was performed using a glucose standard and an UV-vis spectrophotometry equipment.

Results: The validity of the RT was corroborated as an efficient, reliable, fast, easy and economical diagnostic tool. The linearity and sensitivity of the test complied ($R^2 \geq 0.98$). The effectiveness of the method was verified, with an acceptance criterion of (80-120%) and a coefficient of variation $\leq 3\%$.

Conclusion: According to the results obtained, the glucometer is a quick, economical and reliable tool to monitor the blood glucose levels of patients who come to the clinic veterinary for the prevention and / or diagnosis of related diseases such as overweight, obesity, insulin resistance and diabetes, diseases that in the last decades have become very important due to their epidemiological importance in the world.

Keywords: Glucose, dog, diabetes, obesity, diagnosis, prevention.

* Corresponding author: Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico.

XIII. CUADRO DE LITERALES:

- CC = Condición corporal
- DM = Diabetes Mellitus
- PO = Vía oral (Per os)
- IV = Vía intravenosa
- ATP= Adenosín Trifosfato
- GLUT-1 = Glucocotransportador de sodio-glucosa
- SGLT-1 = Sodium-Glucose Linked Transporter 1
- GLUT-2 = Transportador de glucosa / acarreadora de solutos de glucosa (sensor de homeostasis)
- G-6-P = Glucosa-6-fosfato
- F-6-P = Fructosa-6-Fosfato
- Ca⁺ = Calcio extracelular
- K⁺ = Potasio intracelular
- Canales K⁺ATP = canales de Potasio dependientes de ATP
- Vía MAP/ERK ó MAPK = Vía de las MAP cinasas/ protein quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases)
- Atk/PKB = Proteína quinasa B 1
- Vía PI3K = Vía Fosfatidilinositol-3 quinasa (Phosphatidylinositol 3-kinase)
- Thr = Treonina
- Ser = Serina
- GLUT-4 = Proteína transportadora de glucosa regulada por insulina

- PFK-1 = Fosfofructoquinasa 1
- PK = Piruvato quinasa
- IRS = Receptor de insulina (Insulin Receptor Sustrate)
- Shc = Proteína compuesta por un dominio de fosfotirosina (SH2-containing domain)
- GRB 2 = Proteína adaptadora 2 de unión al receptor de factores de crecimiento (growth factor receptor-bound protein 2)
- SOS = Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
- Ras = Proteína GTPasa que regula crecimiento celular
- GTP = Guanosín trifosfato
- GDP = Guanosín difosfato
- Raf 1 = Raf quinasa 1
- MEK = MAP quinasa
- ERK 1 y 2 = Proteín quinastas 1 y 2 reguladas por señal extracelular (extracellular-signal regulated protein kinases 1 and 2)
- Elk 1 = Factor de transcripción (Ets like gene 1)
- Tyr = Tirosina
- P = Fósforo
- PI3K = Fosfoinositol-3-quinasa
- p85 = Subunidad reguladora de PI3K
- p110 = subunidad catalítica de PI3K
- PIP2 = Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
- PIP3 = Fosfatidilinositol-3-4,5-trifosfato
- GSK 3 = Glucoquinasa 3

- mTOR = Diana de rapamicina en células de mamífero (mammalian Target of Rapamycin)
- FOXO = Factor de transcripción Fox (Forkhead box)
- sCoA = coenzima A
- ACC = Acetil-coenzima A carboxilasa
- ACAT = Acetil-coenzima A acetiltransferasa
- MAG = Monoacilglicerol
- DAG = Diacilglicerol
- TAG = Triacilglicerol
- VLDL = Lipoproteínas de muy baja densidad (very low-density proteins)
- CPT-1 = Carnitina palmitoiltransferasa 1
- EC 1.3.3.6 = Acil-coenzima A oxidasa peroximal (ACO)
- H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno
- ROS/EOR = Especies reactivas de oxígeno
- PPAR γ = Receptor de peroxima-proliferador-activado gamma (peroxime-proliferator-activated receptor gamma)
- SREBP-1c = Proteína de unión al elemento regulador del estero (Sterol regulatory element-binding protein)
- FAS = Sintetasa de ácidos grasos (fatty acid synthase)
- UCP-2 = Proteína desacopladora 2
- PKC = Proteincinasa C
- RE = Retículo endoplásmico
- IP₃ = Inositol-1,4,5 trifosfato

- GPX = Glutación peroxidasa
- SOD = Superóxido dismutasa
- SM = Síndrome Metabólico
- NCEP-ATP-2005 = National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III, 2005
- AAHA = American Animal Hospital Association
- GAD = Glutamato descarboxilasa
- INF- γ = Interferón gamma
- TNF- α = Factor de necrosis tumoral alfa
- Ile = Isoleucina
- Val = Valina
- Ala = Alanina
- CAPE = Fenetil estér ácido caféico
- TBARs = Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
- ALT = Alanina aminotransferasa
- FA = Fosfatasa alcalina
- TP = Tiempo de protrombina
- Na = Sodio
- Cl = Cloro
- AOAC = Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Association of Official Analytical Chemists)
- EM/día = Energía Metabolizable al día
- PC = Proteína Cruda

- EE = Extracto Etéreo
- FC = Fibra Cruda
- Cen = Cenizas
- Hum = Humedad
- E.L.N. = Elementos Libres de Nutrógeno
- AN. GARANTIZADO = Análisis Garantizado
- min = mínimo
- max = máximo
- kcal = kilocalorías
- B100 = Base 100
- BHum = Base Húmeda
- NupOpAd = Nupec Óptimo Adulto

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Enciclopedia del Labrador de Royal Canin. París. Aniwa Publishing, 2006.
2. Case LP., Carey DP., Hirakawa DA., Daristotle L. Nutrición Canina y Felina. Guía para profesionales de los animales de compañía. 2da.ed. Madrid: Harcourt, 2001.
3. Hand MS., Novotny BJ., editors. Pocket Companion to Small Animal Clinical Nutrition. 4th.ed. U.S.A: Mark Morris Institute, 2002.
4. Royal Canin. Enciclopedia de la Nutrición Canina. París: Aniwa Publishing; 2006.
5. Sánchez BM., Aguilar JB. Complicaciones frecuentes en DM canina. FMVZ-UNAM. 2008.
6. Díaz C, Ríos C, Crossley J. Diabetes Mellitus en perros: Técnicas de diagnóstico. Monografías de Medicina Veterinaria [Internet]. 2002 [cited June 2017]; 22 (1-2): 31-39. Available on: <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/viewFile/1029/910>
7. Boron W.F., Boulpaep E.L. Medical Physiology: A cellular and molecular approach. 2nd. Ed. U.S.A: Saunders Elsevier. 2012.
8. Fisiología veterinaria e Introducción a la fisiología de los procesos productivos. FMVZ-UNAM. 2010
9. Church DC. Fundamentos de nutrición y alimentación en animales. 2^a. Ed. México: Limusa; 2002.
10. McDonald. Nutrición Animal. 7^a. Ed. España: Acribia; 2013.
11. Shimada A. Nutrición Animal. 2^a Ed. México: Trillas, 2009

12. Fortich A. Fisiología de la secreción de insulina y glucagón. Fascículos de Endocrinología: Fascículos Diabetes 2009-2011.
13. Castrejón V, Carbó R, Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de educación bioquímica* 2007. 26 (2): 49-57
14. Papperheimer J. Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine, and mannitol in normal animals: relation to body size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1990; 259 (2): G290-G299. Doi: <http://ajpgi.physiology.org/content/259/2/G290.short>
15. Bermudez V, Bermudez F, Arraiz N, Leal E, Linalres S, Mengual E, *et. al.* Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 2007. 26 (2)
16. Sandoval de Jesús R, Vargas B, Flores L, Gurrola C. Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gaceta Médica de México* 2016. 152: 547-57
17. Thorens M. Mechanisms of glucose sensing and multiplicity of glucose sensors. *Ann Endoc* 2004; 65(1): 9-12. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-4266\(04\)95624-7](https://doi.org/10.1016/S0003-4266(04)95624-7)
18. Kieffer J. Gastro-intestinal hormones GIP and GLP-1. *Ann Endoc* 2004; 65 (1): 13-21. [https://doi.org/10.1016/S0003-4266\(04\)95625-9](https://doi.org/10.1016/S0003-4266(04)95625-9)
19. Olivares J, Arellano A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB* 2008; 27 (1): 9-18. ISSN: 1665-1995
20. Carrasco N, Galgani J, Reyes M. Insulin resistance syndrome: diagnosis and management. *Revista Médica Clínica Las Condes* 2013; 24 (5): 827-837. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70230-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70230-X)

21. Roche E. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic β -cell dysfunction. *Ars Pharmaceutica* 2003; 44 (4): 313-332.
22. Poitout V, Robertson R. An integrated view of β -cell dysfunction in type 2 diabetes. *Annu Rev Med* 1996; 47: 69-83. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.47.1.69>
23. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995; 44: 863-870. Doi: <https://doi.org/10.2337/diab.44.8.863>
24. Marlon E. Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. *Front Endocrinol.* 2013; 4: 37. Doi: 10.3389/fendo.2013.00037
25. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801(3):289-98. Doi: 10.1016/j.bbali.2009.08.006
26. Poitout V. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: Myth or reality?. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(5): 901–904. Doi: 10.1042/BST0360901
27. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose Toxicity in β -Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. *Diabetes* 2003; 52 (3): 581-587 doi: 10.2337/diabetes.52.3.581
28. Kim J, Yoon K. Glucolipotoxicity in Pancreatic β -Cells. *Diabetes Metab J.* 2011; 35(5): 444–450. Doi: 10.4093/dmj.2011.35.5.444
29. Bagnati M, Ogunkolade B, Marshall C, Tucci C, Hanna K, Jones T. Glucolipotoxicity initiates pancreatic β -cell death through TNFR5/CD40-mediated STAT1 and NF- κ B activation. *Cell Death & Disease* 2016; 7: e2329. Doi:10.1038/cddis.2016.203

- 30 Halban P, Polonsky K, Bowden D, Hawkins M, Ling C, Mather K. b-Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. *Diabetes Care* 2014; 37(6): 1751-1758. Doi: <https://doi.org/10.2337/dc14-0396>
31. Nuñez L, Bouda J. *Patología Clínica Veterinaria*. 2ª Ed. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM); 2007.
32. Hoenig M. Carbohydrate metabolism and pathogenesis of diabetes mellitus in dogs and cats. *Progress in molecular biology and translational science*. 2014;121:377-412
33. Fall T. *Characterisation of Diabetes mellitus in dogs*. Swedish University of Agricultural Sciences. 2009.
34. Ciobotaru E. Spontaneous diabetes in animals. *Diabetes Mellitus: Insights and perspectives*. Intech. Chapter 15. 2013
35. Guptill L, Glickman L, Glickman N. Time Trends and Risk Factors for Diabetes Mellitus in Dogs: Analysis of Veterinary Medical Data Base Records (1970-1999). *Vet J*. 2003; 165: 240-245 doi:10.1016/S1090-0233(02)00242-3
36. González M, Bernal L. Diagnóstico y manejo de la obesidad en perros: una revisión. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [Internet]*. 2011 [cited June 2017]; 6(2): 91-102. Available on: <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428106008.pdf>
37. Peña C. *Obesidad canina: repercusiones clínicas y factores relacionados (presión arterial y parámetros metabólicos)* [Tesis de doctorado]. Arucas (España): Universidad de las Palmas de Gran Canaria; 2015.

38. Montoya A. Obesidad canina y humana: correlaciones etiopatogénicas [Discurso de ingreso como académico de número]. Madrid (España): Real Academia de Ciencias Veterinarias de España; 2017.
39. Manzano L. Determinación del porcentaje de grasa corporal (GC%) y su relación con la gonadectomía, el tipo de alimentación y actividad física en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) [Tesis de licenciatura]. Ciudad de México (México): Universidad Nacional Autónoma de México; 2015
40. Jeusette I. Obesidad canina. Barcelona (España): Affinity Petcare; 2006.
41. Catchpole B, et.al. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach un new tricks?. *Diabetología* 2005; 48: 1948-1956. doi: 10.1007/s00125-005-1921-1
42. Catchpole B. *et.al.* Genetics of canine diabetes mellitus: are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs?. *The veterinary journal*. 2013; 195, 139-147
43. Catchpole B. *et.al.* Canine DM: from phenotype to genotype. *Journal of Small Animal Practice*. 2008; 49, 4-10.
44. Rand JS. *Et.al.* Canine and feline DM: nature or nurture?. *Centre for Companion Animal Health*. Australia. 2004.
45. Aptekmann K, Schwartz D. A survey of owner attitude and experiences in managing diabetic dogs. *The veterinary journal*. 190 (2011) e122-e124
46. Wang H, Ng T. Natural products with hypogluceic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences* 1999; 65 (25): 2663-2677. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00253-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00253-2)

47. H. Jouad, M. Haloui, H. Rhiouani, J. El Hilaly, M. Eddouks. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre región of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol* 2001; 77 (2-3) 175-182. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00289-6)
48. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 2005; 99 (3): 325-348. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
49. Bailey C. Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 1989; 12 (8): 553-564. Doi: <https://doi.org/10.2337/diacare.12.8.553>
50. Rahul G., Kumar GB. Samta J. and Saxena AM. An overview of indian novel traditional medicinal plants with anti-diabetic potentials. *Afr J Tradit Complement Altern Med* [Internet] 2008 [cited June 2017]; 5(1): 1–17. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2816594/>
51. Nidhi Aggarwal and Shishu . A review of recent investigations on medicinal herbs possessing anti-diabetic properties. *J Nutr Disord Ther* 2011; 1:102. Doi:10.4172/2161-0509.1000102
52. Barbosa-Filho J, Vasconcelos T, Alencar A, Batista L, Oliveira R, Guedes D *et. al.* Plants and their activite constituents from south, central and north America with hypoglycemic activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2005; 15(4): 392-413. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400021>
53. Calderón M, Quiñones M, Pedraza J. Efectos Benéficos del Aloe en la Salud. *Vertientes* [Internet] 2011 [Cited June 2017]; 14 (2): 53-73. Available on: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2011/vre112a.pdf>

54. Choi S, Chung M. A review on the relationship between aloe vera components and their biological effects. *Seminars in integrative medicine* [Internet] 2003 [cited June 2017]; 1 (1): 53-62. Available on: <http://files.qfb303.webnode.mx/200000044-3e8093f7a8/1-s2.0-S154311500300005X-main.pdf>
55. Choi S, Chung M. Evaluation of anti-hyperglycaemic action of different fractions and sub-fractions from aqueous extract of aloe vera linn leaf of alloxan induced type 2 diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed.*2012. (2) 3: 51691-51695. Doi: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60479-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60479-1)
56. Boudreau MD. An evaluation of the biological and toxicological properties of aloe barbadensis (miller) aloe vera. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, part C* 2006; 24 (1): 103-54. Doi: 10.1080/10590500600614303
57. Ajabnoor MA. Effect of aloes on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. *J Ethnopharmacol* 1990; 28 (2): 215-20. Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90031-N](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90031-N)
58. Ghannam N, Kingston M, Al-Meshaal IA, Tariq M, Parman NS, Woodhouse N. The antidiabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observations. *Horm. Res* [Internet] 1986 [cited June 2017]; 24 (4):288-94. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096865>
59. Amira Mourad Hussein Abo-Youssef *, Basim Anwar Shehata Messiha. Beneficial effects of Aloe vera in treatment of diabetes: Comparative in vivo and in vitro studies. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 2013; 51 (1): 7-11. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2012.03.002>
60. Raksha B, Pooja S, Babu S. Bioactive compounds and medicinal properties of Aloe

- vera L.: An update. *Journal of Plant Sciences* 2014; 2(3): 102-107 Doi: 10.11648/j.jps.20140203.11
61. Guardiola F, Sarmiento J, Fernández M. Consideraciones sobre la estabilización de geles de Aloe Vera. Colombia; 2008. Available on: https://documentop.com/consideraciones-sobre-la-estabilizacion-de-geles-de-aloe-vera-sioc_5996e8551723dd84bae8b351.html
62. Hamman J, Vijoer A. Inventors. Tshwane University of Technology; propietario. Use of aloe vera for increasing the bioavailability of poorly absorbable medicine drugs. WO 2009103093 A1
63. Lebitsa T, Viljoen A, Lu Z, Hamman J. In Vitro Drug Permeation Enhancement Potential of Aloe Gel Materials. *Current Drug Delivery* 2012; 9, 297-304. Doi: 10.2174/156720112800389115
64. Hamman J. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules* 2008; 1599-1616. Doi: 10.3390/molecules13081599
65. Domínguez R, Arzate J, Chanona J, Welti-Chanes J. El gel de Aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *RMIQ [Internet]* 2012 [Cited June 2017]; 11 (1): 24-43. Available on: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000100003
66. Lozano L, Nova C, Mejía L. Estabilización del gel de Aloe Barbadensis Miller y disminución de su concentración por adsorción en columna con carbón activado. *ION [Internet]* 2011 [Cited June 2017]; 24(1): 61-67. Available on: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120->

100X2011000100008&script=sci_abstract&tlng=es

67. Nahar T, Uddin B, Hossain S, Sikder AM, Ahmed S. Review: Aloe vera gel protects liver from oxidative stress-induced damage in experimental rat model. *Journal of Complement Integral Medicine*. Mayo 2013. (7) 10. Doi: 10.1515/jcim-2012-0020
68. Lee E, Uhm K, Lee Y, Han M, Lee M, Park J *et al*. CAPE (caffeic acid phenethyl ester) stimulates glucose uptake through AMPK (AMP-activated protein kinase) activation in skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 5;361(4):854-858. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.068>
69. Noriega V. El Propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. [Curso de adaptación al grado]. Cantabria (España): Universidad de Cantabria; 2014.
70. Cuevas A, Saavedra N, Curi R, Abdalla D, Salazar L. Efecto del Propóleos Chileno sobre el Metabolismo de Glucosa en Ratones Diabéticos. *Int. J. Morphol* 2011; 29 (3):754-761. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022011000300015>
71. Tolba M, Azab S, Khalifa A, Abdel-Rahman S, Abdel-Naim A. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* 2013; 65(8):699-709. Doi: 10.1002/iub.1189. Epub 2013 Jul 11
72. Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*. 2003; 54:519-546. Doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938
73. Hirose M, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S, Kato T, Shirai T. Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis* [Internet] 1998

[Cited June 2017]; 19(1):207-212. Available on:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472713>

74. Peppercorn M, Goldman P. Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rats and their intestinal bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 1972 [Internet] 69 [Cited June 2017] (6):1413-5. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC426714/>
75. Ahmed D. Sharma M. Mukerjee A. Ramteke P.W. and Kumar V. Improved glycemic control, pancreas protective and hepatoprotective effect by traditional poly-herbal formulation “Qurs Tabasheer” in streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alt Med* 2013, 13:10. doi: 10.1186/1472-6882-13-10.
76. Fan H. Johnson M.H. Lila M. Yousef G. and Gonzalez de Mejia E. Berry and Citrus Phenolic Compounds Inhibit Dipeptidyl Peptidase IV: Implications in Diabetes Management. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013 (2013): 13 Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/479505>
77. Roopchand D. Kuhn P. Rojo L. Lila M. and Raskin I. Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice. *Pharmacology Research*. Feb 2013; 68(1): 10
78. Nemes-Nagy E1, Szocs-Molnár T, Dunca I, Balogh-Sămărghișan V, Hobai S, Morar R, Pusta DL, Crăciun EC. Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children. *Acta physiologica Hungarica*. 2008 Dec;95(4):383-93.
Doi: 10.1556/APhysiol.95.2008.4.5.
79. Vuong T, Benhaddou-Andaloussi A, Brault A, Harbilas D, Martineau LC, Vallerand D, Ramassamy C, Matar C, Haddad PS. Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice. *International journal of obesity*

(London) 2009 Oct;33(10):1166-73

80. Johnson MH1, Lucius A, Meyer T, de Mejia EG. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 24;59(16):8923-30
81. Johnson MH1, de Mejia EG, Fan J, Lila MA, Yousef GG. Anthocyanins and proanthocyanidins from blueberry-blackberry fermented beverages inhibit markers of inflammation in macrophages and carbohydrate-utilizing enzymes in vitro. *Molecular nutrition & food research*. 2013 Jul;57(7):1182-97
82. Corrales L., Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Revista Ciencias Biomédicas* [Internet]. 2012; 10: 135-250. Available on: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>
83. Ríos M. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva* [Internet]. 2003 [cited June 2017]; 2 (1). Available on: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm>
84. Ferreira C, Vasconcellos R, Pedreira R. Alterations to oxidative stress markers in dogs after a short-term stress during transport, *J Nutr Sci* [Internet]. 2014 [Cited June 2017] 3. Available on: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-nutritional-science/article/alterations-to-oxidative-stress-markers-in-dogs-after-a-short-term-stress-during-transport/AE59292B54A1ACEC60ECBA0F6891BC97>
85. Ratan R, Murphy T, Baraban J. Rapid Communication: Oxidative Stress Induces Apoptosis in Embryonic Cortical Neurons. *J Neurochem* 1994; 62 (1): 376-379. Doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62010376.x
86. Wright E, Scis,-Bacon L, Glass L. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of

- fasting and postprandial glycaemia. *Int J Psychiatry Clin Pract* 2006; 60 (3): 308-314. Doi: 10.1111/j.1368-5031.2006.00825.x
87. Sagols E, Priymenko N. Oxidative Stress in Dog with Heart Failure: The Role of Dietary Fatty Acids and Antioxidants. *Vet Med Int.* 2011; 2011: 5. Doi: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/180206>
88. Russo C, Frederico A, Bracarense L. Oxidative stress in dogs. *Ciencias Agrarias* 2016; 37 (3): 1431-1440. Doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n3p1431
89. Bai X, DiLu, JieBai, Zheng H, Ke Z, Li X, Luo S. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. C* 2004; 314 (1): 197-207. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.073>
90. Hamada Y, Fuji H, Fuka M. Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* 2009; 45 (1): S35-S38. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.004>
91. Ripoll et al., 2012. Evaluation of natural substances' protective effects against oxidative stress in a newly developed canine endothelial cell-based assay and in cell-free radical scavenging assays. *Intern J Appl Res Vet Med.* [Internet]. 2012 [Cited June 2017]; 10: 113-124. Available on: <http://www.jarvm.com/articles/Vol10Iss2/Vol10%20Iss2McGahie.pdf>
92. Effect of Aloe vera gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* [Internet] 2010 [cited June 2017]. 48(8): 837-842. Available on: <http://imsear.li.mahidol.ac.th/handle/123456789/145038>
93. Ortega A. et al. Aloe Vera y su efecto antioxidante para reducir el estrés oxidativo en la diabetes [Internet] 2014 [cited June 2017]. Available on:

<https://prezi.com/sifctmprj8zu/aloe-vera-y-su-efecto-antioxidante-para-reducir-el-estres-ox/>

94. Dong Lu G, Shen H, Maxey C, Choon C, Ong N. Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2007; 28 (9): 1937-1945.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgm143>
95. Wayne G, Warner P, Falvey D. In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A. *Free Radic Biol Med* 2003; 34 (2): 233-242. Doi:
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01242-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01242-X)
96. Koyu A, Ozguner F, Yilmaz H. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health* 2009; 25 (6): 429-434. Doi:
<https://doi.org/10.1177/0748233709106821>
97. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia–reperfusion-induced oxidative stress. *Vasc Pharmacol* 2007; 47 (2-3): 108-112. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.vph.2007.04.008>
98. Koyu A, Ozguner F, Yilmaz H. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on oxidative stress in rat liver exposed to the 900 MHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health* 2009; 25 (6): 429-434. Doi:
<https://doi.org/10.1177/0748233709106821> . Available on:
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11010-006-1267-0>

99. Özyurt H, Kemal M, Akyol Ö, Sögüt S. Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia±reperfusion injury. *Cell Biochem Funct* 2001; 19: 25-263. Doi: 10.1002/cbf.923
100. Hulley SB. *Et.al.* Designing Clinical Research. 3th. Ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Health business. 2007.
101. Crossley J, Díaz C, Concha M. Test rápido de determinación de glicemia (Tiras reactivas): Validación por métodos de laboratorio. RHV [Internet]. 2009 [Cited June 2017]; 1 (1). Available on: https://issuu.com/revistahospitalesveterinarios/docs/revista.vol.1n_1
102. Savageau MA. Biochemical systems analysis. A study of function and design in molecular biology. *Biochem Mol Biol Educ* 1977; 5 (4): 84 doi: 10.1016/0307-4412(77)90075-9
103. Keilin D, Hartree E. Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem J*. [Internet]. 1986 [cited June 2017]; 50 (3): 331-41. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1197657/pdf/biochemj00910-0055.pdf>
104. Nguyen P, Dumon H, Biourge V, Pouteau E. Measurement of Postprandial Incremental Glucose and Insuline Changes in Healthy Dogs: Influence of food adaptation and lenght of time of blood sampling. *Jn. Nutrition*. [Internet]. 1998 [cited June 2017]; 128: 2659S-2662S. Available on: <http://jn.nutrition.org/content/128/12/2659S.long>

105. Paul AE, Shiel RE, Juvet F, Mooney CT, Mansfield C. Effect of hematocrit on accuracy of two point-of-care glucometers for use in dogs. *Am J Vet Res* 2011; 72 (9): 1204-1208 doi: 10.2460/ajvr.72.9.1204
106. Trujillo J. Los glucómetros en la práctica de enfermería. *Desarrollo Científ Enferm.* [Homepage on the internet]. 2011 [cited June 2017]; 9 (10). Available on: <http://www.index-f.com/dce/19pdf/19-328.pdf>
107. Hamid MH, Chishti AL, Magbool S. Clinical utility and accuracy of a blood glucose meter for the detection of neonatal hypoglycemia. *J Coll Physicians Surg Pak* 2004; 14 (4): 225-228. doi: 04.2004/JCPSP.225228
108. Prinzing C, Rosenlund S, Sukeena V, Malinowski C, Wise LC. Precision-to-tolerance capability: an important consideration in tight glucose control. *Am J Critic Care* 2009; 18 (3): 232-239 doi: 10.4037/ajcc2009262
109. Salacinski AJ, Alford M, Drevets K. Validity and Reliability of a Glucometer Against Industry Reference Standards. *J Diabetes Sci Technol* 2014; 8 (1): 95-99 doi: 10.1177/1932296813514315
110. Sandra R, Cordero A, Caralli A, Manganiello L, Mendoza N, Tellería L. Diseño y construcción de un instrumento para determinar la concentración de glucosa. *Revisa Ingeniería UC* [Internet]. 2006 [cited June 2017]; 13 (3): 35-44. Available on: https://www.researchgate.net/publication/230558803_Disenio_y_construccion_de_un_instrumento_para_determinar_la_concentracion_de_glucosa
111. Rao LV, Jakubiak F, Sidwell JS, Winkelman JW, Snyder ML. Accuracy evaluation of a new glucometer with automated hematocrit measurement and

- correction. Clin Chim Acta 2005; 356 (1-2): 178-183 doi:
10.1016/j.cccn.2005.01.027
112. Mann EA, Pidcoke HF, Salinas J, Wade CE, Holcom J, Wolf S. Accuracy of Glucometers Should Not Be Assumed. Am J Crit Care [Internet] 2007 [Cited June 2017]; 16 (6): 531-532. Available from: <http://ajcc.aacnjournals.org/content/16/6/531.2.full>
113. Hulley S, Cummings S, Browner W, Grady D, Newman T. Designing clinical research. 3th ed. U.S.A.: Wolters Kluwer: Health, 2007.
114. Miller J, Miller J. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 6a Ed. México: Pearson (Harlow); 2010
115. Pocket Companion to Small Animal Clinical Nutrition. 4th.ed. U.S.A: Mark Morris Institute, 2002.
116. Asociación Americana Hospitalaria de Animales. Guías para la Evaluación Nutricional de perros y gatos de la Asociación Americana Hospitalaria de Animales (AAHA). J Am Anim Hosp Assoc. 2010; 46 (4). Print ISSN: 0587-2871 Online ISSN:1547-3317.
117. Reglamento del Comité interno para el cuidado y uso de animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (CICUA, FMVZ-UNAM). México. 5 de Mayo de 2014.
118. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Disponible en URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/>

119. Kasangian J. Jarabe de Maíz de Alta fructose y su relación con la obesidad y la industria alimenticia moderna. [Internet][Cited June 2017]. Available on: <http://www.dietarium.com.ar/Investigacion%20Dr%20Kasangian%20Jarabe%20y%20Obesidad.pdf>
120. Olguin B, Posadas M, Revelant G, Labourdette V, Marinozzi D, Venezia M. Efectos del consumo elevado de fructose y sacarosa sobre parámetros metabólicos en ratas obesas y diabéticas. *Rev Chil Nutr* 2015; 42 (2): 151-156. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200006>.
121. Bellinger L, Laborde M, Rosso L, Salvatore A. Asociación entre jarabe de maíz de alta fructosa y diabetes tipo 2 [Trabajo final de grado]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina): Universidad de Buenos Aires; 2016.
122. Sigma-Aldrich. Inventors. Sigma-Aldrich, propietario. Glucose (GO) Assay Kit. Missouri, GAGO 20 CMH/MAM/KMR 01/05-1.
123. Alarcón C, Caballero S, López R, Ocampo L, Vargas D. Effectiveness of a Quick Validated Monitoring Method for Glucose Levels in Dog Blood Compared to the Traditional Chemical Method. *Transylvanian Review* 2017; 25 (23): 6099-6104
124. Guia de Validación de metodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México. [Internet]. México: Colegio QFB México [Cited June 2017] Available from: https://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico
125. Acta para México de la Ley Federal de Alimentos, Drogas y Cosméticos (LFAMC ó FFDCA por sus siglas en inglés). Disponible en URL:

http://www.proz.com/kudoz/english_to_spanish/business_commerce_general/728753-federal_food_drugs_and_cosmetics_act.html

126. Official Methods of Analysis. Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. AOAC [Internet] 2002 [Cited June 2017]. Available from: www.aoac.org.
127. United States Department of Agriculture (USDA). Disponible en URL: <http://www.usda.gov/>
128. Rowe R, Sheskey P, Quinn M. editors. Manual de los excipientes Farmacéuticos. 6ª ed. Reino Unido. Real Sociedad Farmacéutica de Gran Bretaña, Londres, 2009.