





Constancia de Número
 Número Internacional Normalizado del Libro
 Agencia Mexicana del ISBN
 AGENCIA Mexicana ISBN
 www.indautor.gob.mx
 No Radicación 368854

Fecha de Solicitud: 2019-03-25

Tipo de Obra		Información del Título	
ISBN Obra Independiente: 978-607-95228-9-6		Título: Desarrollo Científico en México	
ISBN Volumen:		Título:	
ISBN Obra Completa:		Título:	
Sello Editorial: Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. (607-95228)			
Subtítulo			
Subtítulo Obra Independiente:			
Subtítulo Obra Volumen:			
Subtítulo Obra Completa:			
Tema			
Materia: Educación, investigación, temas relacionados con la tecnología		Tipo de Contenido: Libros Universitarios	
Colección:	No Contenido:	Serie:	
IDIOMAS			
Español			
Colaboradores y Autor(es)			
Nombre	Nacionalidad	Del	

DECLARACIÓN LEGAL

EDITORES:

Gloria Verónica Vázquez García

Amalia Martínez García

Cristina E. Solano Sosa

María Eugenia Sánchez Morales

Eva Liliana Ramos Guerrero

ISBN: 978-607-95228-9-6

El contenido de los artículos es responsabilidad de los autores.

EDITORIAL

Centro de Investigaciones en Óptica, A.C. (607-95228) D.R.
Loma del Bosque 115 Col. Lomas del Campestre,
C.P.37150 León, Guanajuato, México

Hecho en México

EVALUACIÓN DE LA INGESTA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* SOBRE IL-10 EN PACIENTES CON DM2

Elizabeth Reyes Mier¹, Irma Elizabeth González Curiel^{1,2}, Omar Palacios Lara^{3,4}, Sol María Quirarte Báez⁴, Ana Lourdes Zamora Perez⁵, Claudia Araceli Reyes Estrada⁶, Rosalinda Gutiérrez Hernández⁷ y Blanca Patricia Lazalde Ramos^{1,2}

¹Maestría en Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, ²Maestrías en Ciencias y Tecnología Química de la Universidad Autónoma de Zacatecas, ³CAPASITS, Secretaría de Servicios de Salud de Zacatecas, ⁴Instituto Mexicano del Seguro Social, Zacatecas, ⁵Instituto de Investigación en Odontología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, ⁶Maestría en Ciencias de la Salud, Unidad Académica de Medicina, Universidad Autónoma de Zacatecas, ⁷Licenciatura en Nutrición, Unidad Académica de Enfermería, Universidad Autónoma de Zacatecas
Correo electrónico: blancalazalde@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria, cuya principal función es detener el daño a los órganos y tejidos; jugando un importante papel en enfermedades infecciosas, inflamatorias, autoinmunes y metabólicas. Actualmente, se conoce que la concentración serológica de IL-10 se encuentra disminuida en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) en comparación con los individuos control, situación que agrava y promueve las complicaciones clínicas. Existen diversas terapias inmunomoduladoras de origen herbolario que mejoran los parámetros inflamatorios de esta enfermedad. Recientemente, se ha descrito que el *Rosmarinus officinalis* tiene propiedades anti-inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*. **Objetivo:** Cuantificar las concentraciones de IL-10 antes y a los 90 días de la terapia complementaria con extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* en pacientes con DM2. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron 17 muestras de la Seroteca del Laboratorio de Etnofarmacología de la Universidad Autónoma de Zacatecas, obtenidas de pacientes DM2 que estuvieron bajo tratamiento con metformina y/o glibenclamida a los cuales se les adicionó la terapia complementaria con el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* a una dosis de 2g/litro/día durante 90 días. La cuantificación de IL-10 se realizó mediante el kit de ELISA de acuerdo a las indicaciones del fabricante. **Resultados:** Las concentraciones serológicas de IL-10 en los pacientes con DM2 después de la ingesta del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* incrementaron de forma no estadística, (110.8 ± 27.38 pg/mL a 131.3 ($75 - 356.3$) pg/mL; $p=0.546$). **Conclusiones:** A pesar que no se encontró una diferencia significativa antes y después de la terapia complementaria, sí, se observó una tendencia al incremento sobre las concentraciones serológicas de IL-10, sugiriendo un efecto inmunomodulador del extracto acuso de *Rosmarinus officinalis* en pacientes con DM2.

INTRODUCCIÓN

La *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) es una de las enfermedades metabólicas más común en el mundo; se caracteriza por resistencia a la insulina, hiperglucemia y dislipidemia. Respecto a esta última, se ha propuesto la obesidad como agente causal de la resistencia a la insulina. Algunos investigadores proponen que la hiperlipidemia y los ácidos grasos causan resistencia a la insulina, regulando negativamente la señalización mediada por ésta y debido al metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético (1-3). Sin embargo, la evidencia gira en torno al concepto de que la resistencia a la insulina se asocia con un proceso inflamatorio crónico de bajo grado (4). En este sentido, ha surgido la inquietud de sugerir que la DM2 sea considerada también como una enfermedad perturbada por la respuesta inmunológica al existir un patrón característico de citocinas (MCP-1, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α y IL-10) y células en esta enfermedad (5).

Dentro de las citocinas con efectos más detrimentales se encuentran las citocinas pro-inflamatorias: Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6). Se ha descrito que ambas citocinas, se encuentran elevadas en sujetos diabéticos-obesos y se ha demostrado que causan resistencia a la insulina tanto en humanos como en modelos experimentales (8-10). En contraste, la interleucina-10 (IL-10), citocina anti-inflamatoria se encuentra en bajos niveles plasmáticos en estos pacientes. Interesantemente, un pequeño incremento de ésta, se le ha asociado positivamente con la sensibilidad a la insulina (6,7,11-13).

La IL-10 es una citocina secretada por una variedad de células del sistema inmunológico como los macrófagos activados alternativamente (M2), linfocitos T reguladores (Treg) y linfocitos

cooperadores 2 (Th2). Independientemente de su fuente, su principal función es inhibir la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias implicadas de forma directa en el daño tisular y orgánico (15). De modo que, los efectos inmunosupresores de IL-10 implican tanto la inhibición de la síntesis de citocinas (por ejemplo, TNF- α , IL-6) y sus actividades biológicas en las células diana (16).

El evento de señalización intracelular afectado por IL-10 implica la translocación nuclear del transductor de señal y el activador de transcripción 3 (STAT3) y la transcripción de genes sensibles a STAT3, incluido SOCS3 (17). Estudios previos que examinaron el papel de la IL-10 en la diabetes se han dirigido principalmente hacia las células β pancreáticas y la patogénesis de la diabetes tipo 1 (18). Se demostró que la IL-10 aumenta las funciones de las células β pancreáticas en respuesta a la glucosa *in vitro* y el tratamiento con IL-10 redujo significativamente la insulinitis y previene el inicio de la diabetes en ratones diabéticos no obesos (19). También, se ha reportado que la IL-10 atenúa la resistencia a la insulina después de la infusión aguda de lípidos (20). Esta observación preliminar sugiere que IL-10 puede ser un regulador positivo de la sensibilidad a la insulina, una noción que es consistente con otros informes que indican que los polimorfismos y haplotipos del promotor de IL-10 están asociados con la obesidad y la resistencia a la insulina (21.) Lumeng y colaboradores (22) demostraron que los macrófagos de tejido adiposo de animales delgados se polarizan hacia un estado activado alternativamente (M2) y éste se asoció con una expresión aumentada de IL-10. Este estudio también demostró que la IL-10 aumenta la absorción de glucosa y protege contra la resistencia a la insulina mediada por TNF- α en adipocitos aislados (22). En el 2002, se reportó que existía una relación entre niveles bajos de IL-10 con síndrome metabólico y DM2 en una población de adultos mayores. Algo similar fue reportado en un grupo de pacientes con enfermedades metabólicas con niveles significativamente menores de IL-10 y niveles significativamente superiores de TNF- α contra un grupo control sin enfermedades metabólicas (23,24).

Desde hace cientos de años las plantas se han utilizado como remedios para diversas enfermedades, Dentro de las plantas a las cuales se les ha adjudicado efecto anti-inflamatorio se encuentra *Rosmarinus officinalis* mejor conocido como Romero (25), a la cual se le ha atribuido efecto anti-inflamatorio tanto *in-vitro*, *in-vivo* y en estudios clínicos (26, 27).

Se ha establecido el efecto antiinflamatorio del aceite esencial de romero en modelo murino de inflamación con carragenano (28). De igual manera, se demostró que neutrófilos incubados con extracto de Romero disminuían la oxidación de luminol (29). Así mismo, se evaluó el efecto antiinflamatorio del ácido carnósico de *Rosmarinus Officinalis* en un modelo de estrés oxidativo/nitrosativo con lipolisacárido (LPS) evaluando TNF- α e IL-6 (30). Del mismo modo se reportó que los niveles de IL-6 e Interferon gamma (IFN- γ) disminuyó en los ratones tratados con ácido ursólico portadores de la enfermedad de injerto en comparación con los ratones no tratados (31). En ratones, dosis intratraqueales de componentes volátiles del romero inhibieron el incremento de eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares en las vías respiratorias y en el líquido de lavado broncoalveolar, y suprimió la expresión de interleucina 13 (IL-13) (26).

Actualmente, existen tres estudios clínicos que evalúan el efecto de *Rosmarinus officinalis* como adyuvante en el tratamiento farmacológico de la DM2 (32-34). Sin embargo, en ninguno de ellos se ha evaluado el efecto inmunomodulador de *Rosmarinus officinalis*, por lo cual en este trabajo se evaluó el efecto de la ingesta del extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* sobre IL-10 en pacientes con DM2 bajo tratamiento con metformina y/o glibenclamida.

PARTE EXPERIMENTAL

Tipo de estudio

Estudio transversal, experimental

Población de estudio

Se seleccionaron 17 muestras de pacientes de la Seroteca del Laboratorio de Etnofarmacología de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Las muestras pertenecían a pacientes con diagnóstico DM2, ambos sexos, bajo tratamiento farmacológico a base de metformina y/o glibenclamida, a los cuales se había adicionado terapia complementaria con extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* a dosis de 2 gr por litro de agua durante 90 días.

Cuantificación de IL-10

Para la cuantificación de IL-10 se usó un kit comercial de ELISA, desarrollado bajo la marca Peprotech de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con la prueba de Shapiro-Wilk, para conocer su distribución y posteriormente se realizó una prueba de Wilcoxon y se determinó el coeficiente de correlación de Spearman.

Consideraciones éticas

Este proyecto se realizó bajo los lineamientos que establece la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en el Título Segundo, Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo II, artículo 65, Investigación Farmacológica. Además, se sometió a evaluación por el Comité de Investigación y Ética en Investigación Estatal con número de aprobación 15 CI 32 056 0514, por el Comité Estatal de bioética con el número de aprobación 003/CEB 2015 y por el Comité de Investigación y Ética en Investigación del Hospital General 450 de la SSA con número de folio: 023.

RESULTADOS

De los 17 pacientes que se incluyeron en el estudio solo se obtuvieron datos por encima del valor detectable de 7 pacientes en muestras de antes y después de la terapia complementaria con *Rosmarinus officinalis*; en 6 pacientes no fue posible detectable las concentraciones de IL-10 antes de la terapia complementaria y en 4 pacientes después de la terapia complementaria con el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* (Tabla 1).

Número de paciente	Concentración de IL-10 pg/mL	
	Antes de la terapia complementaria	A los 120 días de la terapia complementaria
1	156.25	ND
2	100	ND
3	ND	81.25
4	ND	706.25
5	ND	50
6	243.75	ND
7	206.25	137.5
8	37.5	75
9	93.75	131.25
10	212.5	87.5
11	68.75	150
12	ND	162.5
13	ND	81.25
14	112.5	356.25
15	43.75	106.25
16	ND	518.75
17	25	ND

Tabla 1: Concentraciones de IL-10 en suero de pacientes con DM2 bajo terapia complementaria con *Rosmarinus officinalis*. ND= No detectable.

De los 7 pacientes que si se contaba con sus valores de IL-10 antes y después de la terapia complementaria, 5 de ellos presentaron un incremento en los niveles de IL-10 después de la los 90 días de la terapia complementaria con *Rosmarinus officinalis*, y los dos pacientes restantes mostraron un decremento de IL-10 después de la terapia complementaria, lo que se podría atribuir a una falta de apego al tratamiento o a algún otro proceso inflamatorio subyacente durante el estudio (Figura 1).

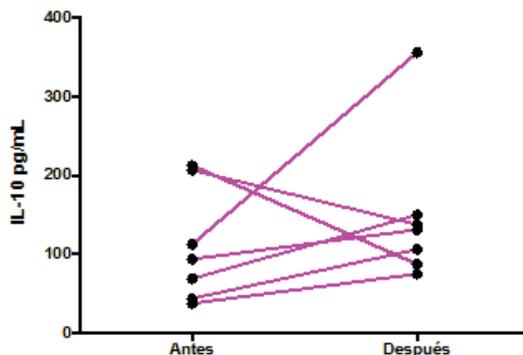


Figura 1. Comportamiento de los niveles de IL-10 en pacientes con DM2 antes y después de la terapia complementaria con *Rosmarinus officinalis*.

En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos de la comparación entre los valores de IL-10 antes y a los 90 días de la terapia complementaria con *Rosmarinus officinales*, como se puede observar no se encontró diferencia significativa entre el tiempo 0 y los 90 días de terapia ($p=0.54$). Sin embargo, se observa una tendencia al incremento de los valores de IL-10 a los 90 días de la terapia complementaria con *Rosmarinus officinalis*, a pesar de ser una N pequeña.

IL-10	Tiempo	[pg/mL]	IC 95%	P
	0 días	110.8 ± 27.38^t	43.80 – 177.8	
	90 días	131.3 (75 – 356.3)#	125 – 243.8	

Tabla 2: Concentraciones de IL-10 pg/mL en suero de pacientes antes y después de la terapia complementaria con *Rosmarinus officinalis*. $\bar{X} = X \pm DE$, #= Mediana (Rango), $n=7$

Al momento de realizar la correlación entre el porcentaje de hemoglobina glicada (HbA1c) y las concentraciones séricas de IL-10, se observó una asociación negativa con una $r = -0.75$, y un valor de $p=0.0663$ (Figura 2).

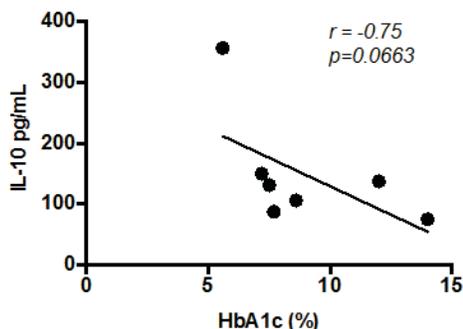


Figura 2. Análisis de correlación de Spearman. Se observa una asociación negativa, es decir, cuando el % de HbA1c incrementa las concentraciones séricas de IL-10 disminuyen, indicando que el control glucémico es un factor clave en la adecuada producción de IL-10.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar una tendencia al incremento de los niveles de IL-10 a los 90 días de la terapia complementaria con el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* no siendo significativa. Sin embargo, es importante incrementar el número de pacientes para dejar claro el papel inmunomodulador de *Rosmarinus officinalis* sobre IL-10 en los pacientes

con DM2 y contrastarlo con algunos parámetros bioquímicos de relevancia clínica como las concentraciones de insulina e incluso citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α .

REFERENCIAS

1. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785–789
2. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3–10
3. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:171–176
4. Wellen KF, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111–1119
5. Giuliotti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77:47–57
6. Rodríguez KF, Pietrani NT, Bosco AA, Campos FMF, Sandrim VC, Gomes KB. IL-6, TNF- α , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Arch Endocrinol Metab.* 2017;1(0).
7. Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21:489–94.
8. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 1998;41:1241–1248
9. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol* 2001;280:E745–E751
10. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87–91
11. van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG, the Leiden 85 Plus Study. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002;51:1088–1092
12. Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1055–1058
13. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Krukowska A, Gorska M. Plasma interleukin-10 concentration is positively related to insulin sensitivity in young healthy individuals. *Diabetes Care* 2005;28:2036–2037
14. Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103:131–136
15. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29(1):71-109.
16. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:929–979
17. Yamanaka Y, Nakajima K, Fukada T, Hibi M, Hirano T. Differentiation and growth arrest signals are generated through the cytoplasmic region of gp130 that is essential for Stat3 activation. *EMBO J* 1996;15:1557–1565
18. Yang Z, Chen M, Wu R, Fialkow LB, Bromberg JS, McDuffie M, Naji A, Nadler JL. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 2002;168:6479–6485
19. Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:169–175
20. Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 2004;53:1060–1067
21. Scarpelli D, Cardellini M, Andreozzi F, Laratta E, Hribal ML, Marini MA, Tassi V, Lauro R, Perticone F, Sesti G. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with

- obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in Caucasian Italian subjects. *Diabetes* 2006;55:1529–1533
22. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–184
23. Herder C, Carstensen M, Ouwens DM. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15 Suppl 3:39-50.
24. Kumari R, Kumar S, Ahmad MK, et al. Diabetes & Metabolic Syndrome : Clinical Research & TNF- α / IL-10 ratio : An independent predictor for coronary artery disease in North Indian population. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2017.
25. Ghasemian M, Owlia S, Owlia MB. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. *Adv Pharmacol Sci*. 2016;2016.
26. Ulbricht C, Abrams TR, Brigham A, et al. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. *J Diet Suppl*. 2010;7(4):351-413.
27. Sedighi R, Zhao Y, Yerke A, Sang S. Preventive and protective properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: A brief review. *Curr Opin Food Sci*. 2015;2(October 2016):58-70.
28. Takaki I, Bersani-Amado LE, Vendruscolo A, et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. *J Med Food*. 2008;11(4):741-746.
29. Rocha J, Eduardo-figueira M, Barateiro A, et al. Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. 2015:398-413.
30. Xiang Q, Liu Z, Wang Y, et al. Carnosic acid attenuates lipopolysaccharide-induced liver injury in rats via fortifying cellular antioxidant defense system. *Food Chem Toxicol*. 2013;53:1-9.
31. Checker R, Sandur SK, Sharma D, et al. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. *PLoS One*. 2012;7(2).
32. Labban L, Mustafa UE-S, Ibrahim YM. The Effects of Rosemary Leaves Powder on Glucose Level, Lipid Profile and Lipid Peroxidation. *Int J Clin Med*. 2014;5(6):297-304.
33. Abdulrahim AJ. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on lipid profiles and blood glucose in human diabetic patients (type-2). *African J Biochem Res*. 2014;8(8):147-150.
34. Lazalde-Ramos BP, María S, Báez Q, et al. Efecto antimicronucleogénico y citoprotector del extracto acuoso de Romero (*Rosmarinus officinalis*) en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. *Cimel*. 2016;21(2)(5):10-14.