



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio del efecto hipoglucemiante de la parte aérea de
Hamelia patens Jacq. en ratas con hiperglucemia inducida
STZ-NA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A :

Viridiana García Luna



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Adolfo Andrade Cetto**

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

García
Luna
Viridiana
15395453
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
307230522

2. Datos del tutor

Dr.
Adolfo
Andrade
Cetto

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Guevara
Fefer

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Helia Reyna
Osuna
Fernández

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Sonia Marlen
Escandón
Rivera

6. Datos del sinodal 4

Biol.
Gerardo
Mata
Torres Valle

7. Datos del trabajo escrito.

Estudio del efecto hipoglucemiante de la parte aérea de *Hamelia patens* Jacq. en ratas con hiperglucemia inducida STZ-NA
47 p
2016

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa de estudios que me permitió formarme como profesionalista.

A la DGAPA, PAPIIT (proyecto IN 214413) por los recursos que brindó para financiar el proyecto.

A la DGAPA, PAPIIT (proyecto IN 214413) por las becas de licenciatura que apoyaron el proyecto.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y brindarme el apoyo para concluir el trabajo experimental y escrito.

A la Dra. Sonia Escandón Rivera que me apoyo en la sección de fitoquímica, así como los aportes en la revisión de la tesis.

Al Biol. Gerardo Mata Torres Valle por sus aportaciones y observaciones en el trabajo escrito.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer y a la Dra. Helia Reyna Osuna Fernández por ser parte de mis sinodales sus observaciones y aportes a la revisión de tesis.

A la Biol. Artemisa Espinoza Hernández por su ayuda en la edición de este trabajo.

Al Biol. Christian Cabello Hernández por su apoyo en las fotografías de CCF.

Agradecimientos personales

A mis padres por ser mi ejemplo a seguir y darme siempre palabras de aliento y apoyo para la conclusión de esta primer meta.

A mis hermanas Nadia y Andrea por estar siempre en los momentos buenos y malos de este proceso.

A mis compañeros del laboratorio Rocío, Grisel, Gaby, David y Gerardo por hacer más agradable el trabajo.

A Frida y Pirlo por enseñarme que la vida se disfruta a cada momento, porque son mi mejor distracción.

Índice

1. Resumen	- 6 -
2. Introducción	- 7 -
3. Antecedentes	- 8 -
3.1 Diabetes Mellitus (DM)	- 8 -
3.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	- 9 -
3.2.1 Secreción de insulina y defectos en la célula β	- 10 -
3.2.2 Órganos blanco y resistencia a la insulina (RI)	- 12 -
3.2.3 Complicaciones	- 14 -
3.2.4 Factores de riesgo.....	- 14 -
3.2.5 Diagnóstico	- 15 -
3.2.6 Prevalencia	- 16 -
3.3 Tratamiento para la DM2	- 16 -
3.3.1 Dieta y ejercicio.....	- 16 -
3.3.2 Hipoglucemiantes orales.....	- 17 -
3.3.3 Glibenclamida	- 19 -
3.4 Medicina Tradicional	- 20 -
3.5 Etnofarmacología	- 21 -
3.5.1 Plantas hipoglucemiantes	- 21 -
3.6 Modelos animales de DM2	- 23 -
3.6.1 Modelo Estreptozotocina-Nicotinamina (STZ-NA)	- 25 -
3.7 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	- 25 -
3.8 <i>Hamelia patens</i>	- 26 -
4. Justificación	- 30 -

5. Objetivos	- 30 -
6. Hipótesis	- 30 -
7. Método	- 31 -
7.1 Colecta de <i>Hamelia patens</i>	- 31 -
7.2 Obtención de extractos	- 31 -
7.3 Cálculo de la dosis y DER (Drug extract ratio).....	- 32 -
7.4 Animales de experimentación.....	- 32 -
7.5 Inducción de hiperglucemia mediante el modelo STZ-NA	- 32 -
7.6 Estudio farmacológico	- 33 -
7.7 Estadística.....	- 34 -
7.8 CCF	- 34 -
8. Resultados	- 37 -
8.1 Cálculo DER.....	- 37 -
8.2 Estudio farmacológico	- 37 -
8.3 CCF	- 40 -
9. Discusión	- 42 -
10. Conclusiones	- 45 -
11. Referencias	- 47 -
12. ANEXO 1. Hypoglycemic effect of <i>Hamelia patens</i> Jacq., aerial part in STZ-NA-induced diabetic rats.....	-52 -

Índice de figuras

Figura 1. Fisiopatología de la DM2.....	- 10 -
Figura 2. Esquema de la secreción de insulina regulada por glucosa	- 11 -
Figura 3. Imagen de la secreción de insulina mediada por glibenclamida	- 19 -
Figura 4. H Estructura química de los fármacos utilizados para la inducción de hiperglucemia	- 25 -
Figura 5. Imagen de <i>Hamelia patens</i>	- 27 -
Figura 6. Mapa de referencias donde se ha determinado la distribución de <i>H. patens</i> -	28 -
Figura 7. Ácido caféico.....	- 34 -
Figura 8. Quercetina	- 34 -
Figura 9. Ácido clorogénico.....	- 34 -
Figura 10. Rutina	- 34 -
Figura 11. Gráfica de la media del comportamiento de cada tiempo de los grupos con su respectivo tratamiento.....	- 34 -
Figura 12. Imagen A: Placa para identificar flavonoides agliconas, e. imagen B: Flavonoides glicosilados	- 34 -
Figura 13. Imagen C: Placa para detección de terpenos. Imagen D: detección de glicósidos. Imagen E: detección de alcaloides	- 34 -

Índice de cuadros

Cuadro 1. Valores glucosa en ayuno, tolerancia de glucosa, glucosa casual y HbA1c que determinan el diagnóstico de DM2 y prediabetes.....	- 16 -
Cuadro 2. Algunos grupos de hipoglucemiantes orales para el tratamiento de la DM2-	18 -
Cuadro 3. Grupos formados y tratamiento administrado.....	- 33 -
Cuadro 4. Rendimiento de cada extracto de acuerdo con el DER.....	- 34 -
Cuadro 5. Muestra la media de cada tiempo de los diferentes grupos, así como el error estándar.....	- 34 -
Cuadro 6. Número de bandas detectadas en CCF para las diferentes pruebas de metabolitos secundarios los extractos E-A y A de <i>H. patens</i>	- 34 -

1. Resumen

En México hay 13.5 millones de personas diagnosticadas con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sin embargo no todas tienen acceso a un buen sistema de salud y en algunas comunidades prefieren el uso de la medicina tradicional como tratamiento de la enfermedad. En diferentes estudios en comunidades rurales se ha mencionado el uso de *Hamelia patens* como parte del tratamiento para la DM2.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la parte aérea (hojas, tallo, flores y frutos) de *H. patens* tiene efecto hipoglucemiante, para lo que se hicieron dos diferentes extractos (acuoso e hidroalcohólico). Se formaron 7 grupos: control normoglucémico, control hiperglucémico, hiperglucémico -glibenclamida y para cada extracto se hicieron dos grupos, a uno de ellos se le administró la dosis tradicional de extracto y al otro se administró la dosis tradicional elevada 10 veces; la glibenclamida como los extractos fueron administrados vía oral a ratas Wistar con hiperglucemia inducida mediante el modelo STZ-NA

Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) de ambos extractos para saber la presencia o ausencia de grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, terpenos, alcaloides y glicósidos).

Se comprobó el efecto hipoglucemiante de *H. patens* para ambos extractos, teniendo mayor efecto el extracto hidroalcohólico, ya que muestra diferencias significativas a partir del T60, mientras que el extracto acuoso muestra su efecto hipoglucemiante de manera estadística hasta el T120. Ninguno de los extractos al aumentar la dosis mostró un mayor efecto hipoglucemiante.

En las pruebas de CCF se observó la presencia de flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados, terpenos y glicósidos. Por medio del cálculo del Rf y el uso de los controles correspondientes se pudo determinar la presencia de quercetina, ácido cafeico y ácido clorogénico.

Como conclusión, ambos extractos tienen efecto hipoglucemiante y la diferencia en el efecto es posible que se deba a que algunos metabolitos se encuentran en mayor abundancia en el extracto hidroalcohólico.

2. Introducción

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o el organismo no utiliza eficazmente dicha hormona. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia, que con el tiempo daña gravemente órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (OMS, 2014^a).

Se calcula que actualmente existen alrededor de 415 millones de personas en el mundo padecen diabetes, y se estimó que a finales del 2015 esta enfermedad provocó 5 millones de muertes y además representó un gasto de 673 billones de dólares en los sistemas de salud (FID, 2015).

El tratamiento de la diabetes incluye insulina, así como hipoglucemiantes orales, sin embargo, estos medicamentos tienen efectos adversos, y en el control de esta enfermedad crónica pierden su efecto; de tal manera que la búsqueda de opciones terapéuticas más efectivas y seguras continúa siendo un área de investigación importante. Aunado a esto, existen comunidades rurales en México en las que la medicina tradicional forma parte importante para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2); se han registrado más de 400 tratamientos naturales con plantas, pero sólo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica; entre las que se encuentran *Cecropia obtusifolia*, *Allium sativum*, *Equisetum myriochaetum*, *Ipomea batatas*, *Acosmium pamanense*, entre otras (García, *et al*, 2009; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Hamelia patens ha sido reconocida como una planta importante en el tratamiento de la (DM2), ya que hay datos publicados de su uso en Oaxaca, San Luis Potosí e Hidalgo, sin embargo, no tiene estudios farmacológicos que lo validen. Por lo cual en este trabajo se realizó una evaluación del efecto hipoglucemiante en ratas STZ-NA; además de conocer los principales metabolitos secundarios al realizar cromatografía en capa fina (CCF).

3. Antecedentes

3.1 Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus es un grupo de alteraciones metabólicas que se caracteriza por una hiperglucemia crónica dada por defectos en la secreción de insulina, su acción o ambos (ADA, 2013).

La acción deficiente en los órganos blanco de la insulina afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2013) existen 4 tipos diferentes de diabetes:

- Diabetes tipo 1 (DM1). Es aquella que esta mediada por una respuesta autoinmune hacia las células β pancreáticas, la cual puede tener diversos factores genéticos y ambientales. Ésta representa del 5 al 10% de los pacientes diabéticos (ADA, 2013). Los marcadores de la destrucción de las células β en general incluyen autoanticuerpos del islote de Langerhans, de insulina y de moléculas de los islotes como la glutamato descarboxilasa (GAD) e interleucina A-2 (IA-2) (Bilbao J. R. *et al*, 2000).

Esta forma de diabetes en los pacientes más jóvenes se manifiesta por primera vez con una cetoacidosis, sin embargo en adultos comienza como una moderada hiperglucemia en ayuno.

Dentro de este tipo también se encuentra la diabetes idiopática, en la que no se sabe su etiología, pero hay una disminución de insulina circulante y una tendencia a cetoacidosis (ADA, 2013).

- Diabetes tipo 2 (DM2). Esta forma representa del 90 al 95% de los pacientes diabéticos. Comprende a individuos con resistencia a la insulina o con cierta deficiencia de ésta al menos inicialmente y que con frecuencia no necesitan insulina para sobrevivir.

La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos o tienen mayor porcentaje de grasa corporal distribuida en la región abdominal. La obesidad causa resistencia a la insulina en cierto grado.

Se diagnostica después de años de haberla padecido, debido a que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en las etapas tempranas no es lo suficientemente grave como para que el paciente presente alguno de los síntomas; los cuales son: poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso y fatiga.

- Otros tipos específicos de diabetes. Estas formas de diabetes se encuentran agrupadas en: defectos genéticos de la célula β , defectos genéticos en la acción de la insulina, endocrinopatías, inducida por algunos medicamentos, causada por alguna infección, enfermedades del páncreas exocrino, formas mediadas por el sistema inmune poco comunes y otros síndromes genéticos.
- Diabetes gestacional. Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con inicio o primer reconocimiento durante el embarazo. La definición se aplica si la condición persiste o no después del embarazo, y no excluye la posibilidad de que la intolerancia a la glucosa pueda haber comenzado de forma conjunta o anterior al embarazo.

3.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

La DM2 se origina por la combinación de resistencia a la insulina (RI), que es un estado patológico en el que hay menor eficiencia biológica de ésta al actuar en sus órganos blanco, condicionando así su aumento en sangre para compensar el mal funcionamiento de la hormona; y por alteraciones en el estado funcional de las células β . El defecto de la célula β en pacientes con DM2 se caracteriza por la ausencia en la respuesta de la primera fase de secreción de insulina y una

respuesta reducida en la segunda fase a una carga de glucosa intravenosa; con los años la secreción de insulina en respuesta al consumo de carbohidratos vía oral se verá alterada (ANCM, 1999; Byrne *et al*, 2004; Aguilar-Salinas, 2008).

En la figura 1. se observan los cambios fisiológicos en algunos órganos provocados por la DM2.

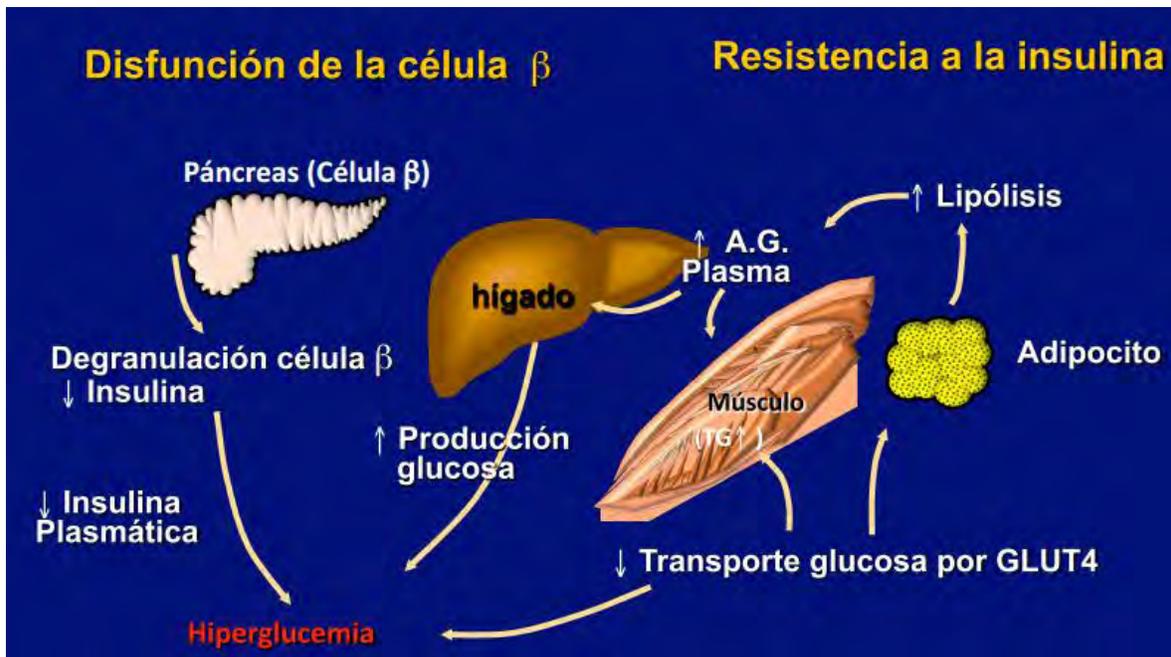


Figura 1. Fisiopatología de la DM2. Tomada de Zamora M. 2012.

3.2.1 Secreción de insulina y defectos de la célula β

La secreción de insulina está altamente regulada por la glucosa e implica retroalimentación entre el hígado, tejidos periféricos y el páncreas. Además de ser regulada por otros nutrientes, hormonas y señales neuronales (Utzschneider *et al*, 2004).

La glucosa necesita de transportadores para atravesar la membrana plasmática de las células, en el caso de la célula β entra a través del transportador de glucosa GLUT2. Una vez que la glucosa ingresa a la célula β es fosforilada a glucosa-6-fosfato por la glucocinasa seguida por el proceso de metabolismo de ésta, al finalizar habrá un aumento en la concentración de ATP. El ATP es

transportado al citosol aumentando el cociente ATP/ADP , lo cual hará que se cierren los canales de K_{ATP} , y por consiguiente la despolarización de la membrana. Esta despolarización hará que se abran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, aumentando así la concentración de Ca^{2+} en el citosol y finalmente desencadenando la exocitosis de insulina (Fig. 2) (Wollheim y Maechler, 2004).

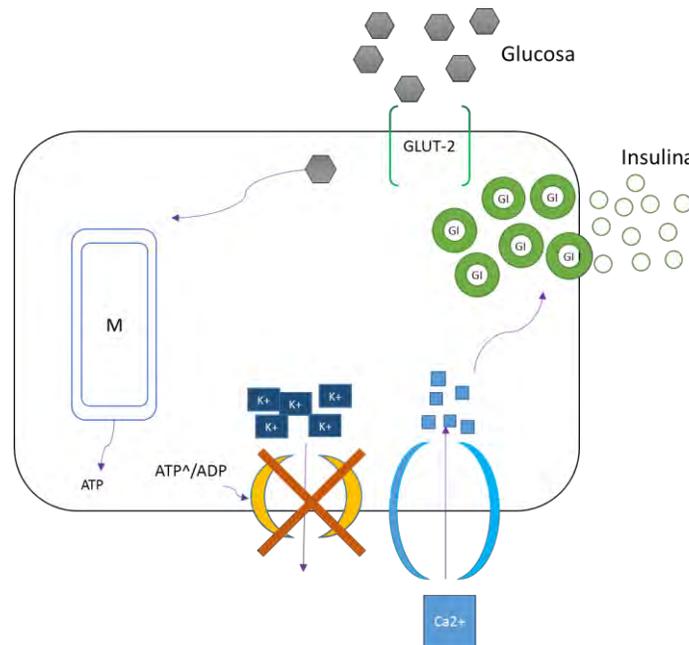


Figura 2. Esquema de la secreción de insulina regulada por glucosa. Donde (M) es mitocondria y (GI) gránulos de insulina.

La insulina tiene una secreción pulsátil cada 11-14 minutos encargada de regular producción de glucosa hepática y después de una carga de glucosa es secretada en dos fases, la primera dura de 5-10 minutos y ocurre inmediatamente después de la ingesta teniendo un gran pico de secreción, éste disminuye e inicia la segunda fase que es prolongada, debido a que termina una vez que ya no hay hiperglucemia. Defectos en la primer fase de secreción de insulina causan intolerancia a la glucosa; la secreción pulsátil de la misma es afectada en la etapa inicial de la DM2 y con el tiempo la hiperglucemia prolongada tendrá un efecto en la función de la célula β , que a largo plazo provocará que se necesite la administración de insulina exógena (Leahy, 2008).

La disfunción de la célula β puede ocurrir por diversos motivos: toxicidad de la glucosa, agotamiento de las células β , lipotoxicidad, alteración en la biosíntesis de proinsulina y alteraciones en el efecto de las incretinas (Leahy, 2008).

3.2.2 Órganos blanco y resistencia a la insulina (RI)

El músculo es un tejido en el que la entrada de glucosa es dependiente de insulina; durante el estado postprandial absorbe del 80 al 85% de glucosa que entra al cuerpo y durante el periodo de ayuno los ácidos grasos son la principal fuente de energía. La presencia de lípidos promueve la oxidación de ácidos grasos e inhibe el metabolismo de la glucosa mediante la inhibición de la hexocinasa, la fosfofructocinasa y la piruvato deshidrogenasa. La alta concentración de glucosa evita la oxidación de ácidos grasos al inhibir a carnitina palmitoiltransferasa 1 (CTP1), que es la enzima llave mediada por malonyl-CoA (Muoio *et al*, 2008).

El tejido adiposo es el órgano de mayor almacenaje de energía en el cuerpo, la cual se encuentra en forma de triglicéridos. Además es un órgano endocrino, jugando un papel importante en la señalización del músculo esquelético, hígado y el sistema nervioso central al secretar a las llamadas adipocitocinas (leptina, resistina, adiponectina) y mediadores de la inflamación como el factor de necrosis tumoral α (TKF α) y la interleucina 6 (IL-6) (Duez y Lewis, 2008).

El receptor de insulina (IR) consta de dos subunidades α extracelulares, que son el sitio de unión de la hormona y dos subunidades β , las cuales tienen tres dominios (extracelular, transmembranal e intracelular). Al unirse la insulina al IR la región en contacto con el citosol se autofosforila adquiriendo la actividad de una tirosina cinasa que puede modificar otros sustratos, siendo los sustratos del receptor de insulina (IRS) uno de ellos. El sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) activa la cascada de señalización de la fosfatidilinositol-3 cinasa (IP3-cinasa) en la cual se activa a la proteína cinasa B (PKB), en el caso de la isoforma β de esta proteína se desplaza de la membrana celular para fosforilar enzimas claves para el metabolismo de carbohidratos y en la translocación de los transportadores de

glucosa GLUT4, los cuales migran a la membrana celular para permitir la entrada de glucosa a la célula (Aguilar-Salinas, 2008).

El consumo de una dieta alta en grasas y el desarrollo de la obesidad están asociadas con el almacenamiento de triglicéridos en sitios diferentes al tejido adiposo, entre los que se encuentran: músculo esquelético, hígado y corazón; así como un aumento en el tamaño de los adipocitos. Además de que en las personas con obesidad la lipólisis no se inhibe en el estado postprandial, síntoma de la RI (Pérez-Aguilar, 2005).

Existen diferentes mecanismos por los que el IRS-1 se fosforila en residuos de serina, lo cual interfiere en la activación de la IP3-cinasa y finalmente en la translocación del GLUT4 (Pérez-Aguilar, 2005; Muoio *et al*, 2008):

- 1) Por intermediarios de lípidos que activan a la proteína cinasa-C θ .
- 2) Por la producción de citosinas pro-inflamatorias, principalmente al factor de necrosis tumoral α (TNF α), que se da por las altas concentraciones de ácidos grasos y la formación de radicales libres de oxígeno que activan a la enzima IKK- β que promueve la activación del factor nuclear NF- $\kappa\beta$.

La ceramida también es considerada responsable de la RI y actúa inhibiendo a la PKB por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y la PKC; además de inhibir la β -oxidación.

El hígado es uno de los principales órganos determinantes de la homeostasis glucosa; en estado de ayuno la glucosa se produce mayormente en el hígado a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis para el suministro del sistema nervioso central. A pesar de que la entrada de glucosa no es dependiente de insulina, ésta juega un papel muy importante en la producción de glucosa, ya que durante el estado postprandial disminuye su producción al inhibir a la enzima fosfoenol piruvato carboxinasa (PEPCK) y a la glucosa-6-fosfatasa (G6P); sin embargo cuando hay RI éstas enzimas no se inhiben y la producción de glucosa no se detiene, lo que aumenta los niveles de glucosa en sangre. (Aguilar-Salinas, 2008).

3.2.3 Complicaciones

Debido a las altas concentraciones de glucosa en sangre, las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden desencadenar discapacidad o la muerte (FID, 2013; Donnelly *et al*, 2000), los cuales se dividen en:

- Microvasculares

Retinopatía. Es un desorden progresivo en el que la red de vasos sanguíneos que irrigan la retina puede bloquearse y dañarse, esto puede provocar ceguera.

Nefropatía. Consiste en proteinuria, la cual a largo plazo puede ocasionar un mal funcionamiento renal que lleve a necesitar diálisis o un trasplante.

Neuropatía. Se puede manifestar en diferentes formas, sin embargo, la más común es una polineuropatía que afecta principalmente el pie, en la cual se pierde la sensibilidad ocasionando ulceraciones y en últimas instancias amputaciones.

- Macrovasculares

Aterosclerosis. Consiste en el bloqueo de las arterias y los principales factores de riesgo para desarrollar este tipo de complicación son: DM2, fumar, hipertensión, altas concentraciones de colesterol y proteinuria.

3.2.4 Factores de riesgo

Uno de los principales factores de riesgo para que se desarrolle la DM2 es la obesidad, afección que va en aumento en todo el mundo. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS estiman que en Belice, México y Estados Unidos, aproximadamente 30% de su población tiene obesidad (INEGI, 2013)

La prediabetes es otro factor de riesgo, el cual, de acuerdo con el comité de expertos de diagnóstico y clasificación de la DM es un grupo intermedio en el que los niveles de glucosa en sangre no son tan elevados como para ser

diagnosticada DM2. Otros factores importantes en el desarrollo de la DM2 son la dislipidemia con triglicéridos elevados, bajos niveles de colesterol HDL, hipertensión y valores de hemoglobina glicada (HbA1c) de 5.7- 6.4% (ADA, 2013).

Existen a la vez factores genéticos que predisponen a las personas, afectando las vías de señalización y secreción de la insulina, estos factores se presentan con mayor frecuencia en algunos grupos étnicos. También se debe tomar en cuenta si durante el embarazo la glucemia fue elevada (FID, 2013).

3.2.5 Diagnóstico

Existen diferentes pruebas que ayudan al diagnóstico de la prediabetes y DM2, cuadro 1:

- La prueba de glucosa en ayuno consiste en tener un ayuno de 8 a 12 h y posteriormente hacer una medición de glucosa en sangre.
- La prueba de tolerancia a glucosa se lleva a cabo después de medir la glucemia en ayuno, al individuo se le da una carga de glucosa oral (75g de glucosa anhidra) disuelta en agua; la medición de glucosa se realiza cada 30 o 60 minutos después de la ingesta, teniendo una duración de 2 a 3h.
- La prueba de glucosa casual se lleva a cabo en personas que tienen alguno o varios de los síntomas.
- La HbA1c es un examen que mide la cantidad de hemoglobina que se glicosila en la sangre. Se recomienda utilizar esta prueba porque cuanto más alto sea el nivel de HbA1c, mayor será el riesgo para el paciente de desarrollar complicaciones microvasculares (Álvarez Eduardo, *et al.* 2009), además de que no es necesario dar alguna carga de glucosa o tener un ayuno para realizarla, la muestra es más estable y presenta menor variabilidad (IEC, 2009).

Cuadro 1. Valores glucosa en ayuno, tolerancia de glucosa, glucosa casual y HbA1c que determinan el diagnóstico de prediabetes y DM2. *valores a las 2h (ADA, 2013).

PRUEBAS	PREDIABETES	DIABETES
GLUCOSA EN AYUNO	100mg/dl a 125mg/dl	126 mg/dl
TOLERANCIA A LA GLUCOSA	140mg/dl a 199mg/dl*	≥ 200 mg/dl*
HBA1C	5.7 a 6.4%	≥ 6.5%
GLUCOSA CASUAL		> 200 mg/dl

3.2.6 Prevalencia en México

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país (INEGI, 2013). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes en México hay 13.5 millones de diabéticos (FID, 2015). En el 2012 se estimó que el gasto para el manejo de la diabetes fue de más de 4,524 millones de dólares, tomando en cuenta que únicamente el 85.75% de las personas diagnosticadas con diabetes atienden su condición de salud (Hernández *et al*, 2013).

3.3 Tratamiento para la DM2

3.3.1 Dieta y ejercicio

La alimentación es uno de los pilares fundamentales para el control de las personas con diabetes, siendo parte del tratamiento integral (Kaufer, 2014); en 1994 la ADA enfocó sus recomendaciones nutricionales hacia individuos en particular, tomando en cuenta su cultura, economía y educación (Steyn *et al*, 2004).

De acuerdo con diferentes asociaciones de diabetes se propone un rango de porcentaje de los nutrientes que se deben consumir diariamente para mantener

niveles adecuados de glucemia; donde el aporte de carbohidratos sea del 40 al 70%, el de proteínas del 10 al 20% y del 30 al 40% de lípidos; además se deben consumir de 6 a 13 g de fibra soluble y menos de 6 g de sodio (Steyn *et al*, 2004; Kaufer, 2014).

La actividad física tiene un papel esencial en promover buena salud y en la prevención de enfermedades como la DM2 y obesidad; así como para el tratamiento de cualquiera de los dos padecimientos (Galbo y Richter, 2004).

En el caso de la DM2, si se sigue una dieta en conjunto con ejercicio leve a moderado en el estado de post-absorción se observará una disminución marcada de la hiperglucemia; lo cual refleja que ésta mejora la captación de glucosa en el músculo inducida por el ejercicio e inhibe el aumento de la producción de glucosa hepática, estos efectos se ven reforzados por el hecho de que la secreción y la concentración de insulina plasmática no se ven disminuidas tan fácilmente como en personas sanas (Galbo y Richter, 2004).

La FID ha reconocido que si la dieta y el ejercicio no son suficientes para el manejo de la DM2 las sulfonilureas y la metformina son la primera opción para el tratamiento farmacológico (Lebovitz y Melander, 2004).

3.3.2 Hipoglucemiantes orales

Son un conjunto heterogéneo de drogas que se caracterizan por producir una disminución de los niveles de glucemia luego de su administración; cumpliendo con este propósito por mecanismos pancreáticos o extrapancreáticos (Chávez Ortiz *et al* 2001).

Cuadro 2. Muestra algunos hipoglucemiantes orales para el tratamiento de la DM2 (Vázquez *et al*, 2005; Lebovitz y Melander, 2004; Habener, 2004).

Secretagogos de insulina	No secretagogos de insulina
<p>Sulfonilureas. Estimulan la primer fase de la secreción de insulina debido a que la región sulfonilurea se une de forma específica al receptor SUR-1 acoplado al canal de K⁺ dependiente de ATP ubicado en la membrana plasmática de la célula β pancreática (Fig. 3).</p>	<p>Biguanidas. Incrementa la sensibilidad a insulina a nivel hepático, disminuye los niveles de insulina endógena hasta en 20% y reduce la producción de glucosa al frenar los mecanismos de glucogenólisis y gluconeogénesis. También aumenta la sensibilidad en músculo y tejido adiposo, pero en menor proporción.</p>
<p>Meglitinidas. Facilita la liberación de insulina de las células β pancreáticas por unión competitiva a los receptores de membrana celular de sulfonilureas, sin embargo, la secreción de insulina es más rápida y dura menos en relación con las sulfonilureas.</p>	<p>Tiazolidineodinas (TZD). Aumentan la captación de glucosa en el músculo, la síntesis de glucógeno y glucólisis. Disminuyen la gluconeogénesis hepática. Modo de acción: se unen a los receptores nucleares PPAR γ; tienen como cofactor al ácido retinoico y actúan como factores de transcripción dando lugar a la síntesis y expresión de los transportadores GLUT 4 y enzimas que participan en el metabolismo intermedio.</p>
<p>Incretinas. Son hormonas peptídicas secretadas por células enteroendocrinas especializadas, que se encuentran en el intestino. Estimulan las secreciones del páncreas endocrino por reacción a la glucosa oral o al consumo de nutrimentos. Se sabe que el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido semejante a glucagon (GLP-1) son las principales hormonas derivadas de la incretina.</p>	<p>Inhibidores de las α-glucosidasa. Son Inhibidores competitivos y reversibles de α-amilasa pancreática y de la α-glucosidasa que se encuentra en el borde de las vellosidades del intestino delgado; esto conduce a un retardo en la digestión de polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos, lo cual finalmente disminuye la intensidad de los picos de hiperglucemia postprandial.</p>

3.3.3 Glibenclamida

Es una sulfonilurea de segunda generación ya que la cadena alifática fue reemplazada por un grupo ciclohexil y el otro extremo de la molécula es estructuralmente más compleja que las de la primera generación; éstas modificaciones le confieren mayor afinidad al sitio de unión del receptor SUR-1 (Lebovitz y Melander, 2004).

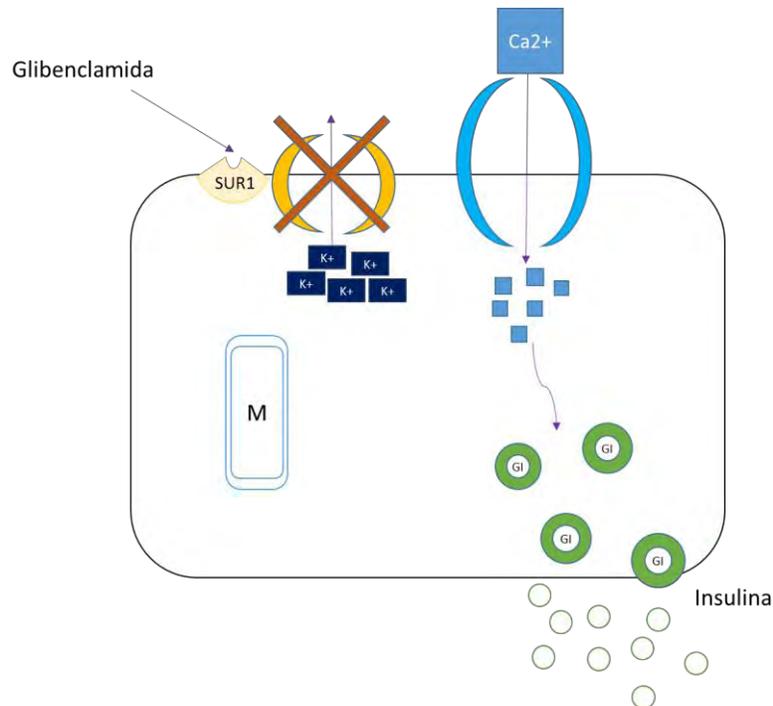


Figura 3. Imagen de la secreción de insulina mediada por glibenclamida. Donde M es mitocondria y GI gránulo de insulina. La glibenclamida se une al receptor SUR1 que está acoplado al canal de K⁺ dependiente de ATP, esto ocasiona el cierre del canal, provocando la despolarización de la membrana y por consiguiente se abren los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje; el aumento de Ca⁺ en el citosol desencadenará la exocitosis de insulina.

3.4 Medicina Tradicional

La medicina tradicional es definida como la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (OMS, 2014^b).

Ésta es reconocida como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos y un componente esencial del patrimonio de las culturas (BDMTM, 2009). En los países en desarrollo y desarrollados es culturalmente aceptada y además de costo accesible en comparación con la medicina alópata. Uno de los principales usos en los que ha destacado ha sido para afrontar el incesante aumento de las enfermedades no transmisibles crónicas. Por lo tanto las medicinas tradicionales de calidad, seguridad y eficacia comprobada contribuyen a asegurar el acceso de todas las personas a la atención médica (OMS, 2014^b).

En México se considera medicina tradicional indígena mexicana, al conjunto de sistemas de atención a la salud que tiene sus raíces en profundos conocimientos de la salud y la enfermedad que los diferentes pueblos indígenas y rurales han acumulado a través de su historia, fundamentados en una interpretación del mundo (cosmovisión), de la salud y enfermedad de origen prehispánico (CDI, 2015).

La medicina tradicional indígena comprende un amplio conjunto de elementos terapéuticos, que incluyen la herbolaria, productos animales y minerales; así como diferentes tipos de masajes, punciones, la utilización de frío y humedad, del calor y humedad, y finalmente la utilización de limpia, ensalmos y diversos ritos (CDI, 2015). Siendo las plantas el recurso material más amplio y valioso de la medicina tradicional indígena (BDMTM, 2009).

3.5 Etnofarmacología

Este término fue utilizado por primera vez en 1967 por Efron. En sus inicios éste fue usado como el principio del desarrollo de nuevos medicamentos o en el descubrimiento de alguno; sin embargo en la actualidad la etnofarmacología se ha centrado en entender los beneficios y riesgos del uso tradicional de plantas con el objetivo de contribuir a un mejor uso de los recursos (Heinrich, 2014).

Recientemente se ha definido como el estudio de los usos tradicionales de compuestos naturales biológicamente activos con el propósito de entender sus acciones terapéuticas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2011).

Es una ciencia multidisciplinaria y se realizan diferentes estudios para tener un conocimiento global, tales como:

- Identificación botánica.
- Realización de estudios biológicos y de biomedicina que ayuden a comprender los usos tradicionales y la importancia de la planta en la comunidad.
- Estudios fitoquímicos y descripción detallada de los extractos.
- Estudios farmacológicos *in vivo*, teniendo controles negativo y positivo, donde además se puedan estandarizar dosis (Heinrich, 2014).

3.5.1 Plantas con actividad hipoglucemiantes

Como sabemos la diabetes es una enfermedad crónica cuya prevalencia va en aumento. Por ello, además de las medidas preventivas y el uso de hipoglucemiantes orales, es importante que estos presenten pocos efectos adversos. En este sentido el uso de la fitoterapia en el tratamiento de la diabetes puede ser de gran utilidad en combinación con la medicina alópata (López, 2006).

Alrededor del mundo se han documentado estudios etnofarmacológicos en donde aproximadamente 1200 especies son utilizadas para tratar los síntomas de la DM2, las cuales van desde algas marinas, hasta plantas superiores. De estas

especies se han aislado alrededor de 200 compuestos con actividad hipoglucemiante; sin embargo, algunos de éstos le deben ese efecto a su actividad tóxica, principalmente hepatotóxica, por lo cual es de suma importancia realizar estudios sobre los mecanismos de acción y toxicidad (Marles y Farnsworth, 1995).

En México a través de estudios etnofarmacológicos se han registrado al menos 306 especies, 235 géneros y 93 familias para el tratamiento de la DM2. Entre las familias más mencionadas están: Asteraceae (47 sp), Fabaceae (27), Cactaceae (16), Solanaceae y Euphorbiaceae (10) y Laminaceae (9) (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Los efectos hipoglucemiantes de algunas plantas usadas en la medicina tradicional se han confirmado a través de estudios *in vivo* e *in vitro*, y los mecanismos de acción son tema de estudio. La importancia de estos estudios radica en que los remedios son efectivos, producen efectos secundarios mínimos y son de bajo costo comparados con los agentes hipoglucemiantes orales sintéticos (García, *et al*, 2009).

Algunas de las especies que cuentan con estudios para el tratamiento de la DM2 son:

Cecropia obtusifolia. Andrade-Cetto y Wiedenfeld en 2001 aislaron dos compuestos a los que se les atribuye el efecto hipoglucemiante; ácido clorogénico e isorientina. La dosis media letal (LD₅₀) del extracto acuoso es de 1450mg/Kg administrados vía i.p.; Revilla-Monsalve, *et al*, 2007 realizó un estudio clínico, en el que administró una dosis diaria del extracto acuoso durante 32 semanas a pacientes diagnosticados con DM2. En este trabajo se corroboró el efecto hipoglucemiante crónico de *C. obtusifolia*.

Equisetum myriochaetum. Su efecto hipoglucemiante ha sido demostrado en ratas diabéticas STZ y en pacientes con DM2. Se han aislado flavonoides como quercetina y kaempferol; sin embargo aún no se conoce el mecanismo de acción (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Acosmium panamense. Se han hecho estudios de la combinación de sustancias aisladas de los extractos butanólico y acuoso en ratas diabéticas STZ, mostrando efecto hipoglucemiante con diferencia significativa en los tiempos 120 y 180 min. Los piranos aislados de ésta son los que le dan la actividad hipoglucemiante (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Allium sativum. La administración oral del extracto etanólico disminuye la glucosa sérica, colesterol total y triglicéridos en ratas diabéticas STZ, pero no en ratas normoglucémicas (García, *et al*, 2009).

Ipomea batatas. Se administró durante 6 semanas a 18 pacientes con DM2, al final de ese tiempo se vio una disminución en los niveles de colesterol, así como de glucosa plasmática; además hubo incremento en la sensibilidad a la insulina (García, *et al*, 2009).

3.6 Modelos animales de DM2

La importancia de la existencia de modelos experimentales no solo radica en conocer la fisiopatología de las enfermedades; sino también en el desarrollo de nuevos medicamentos para su tratamiento (Etuk, 2010).

Los biomodelos experimentales para DM2 se clasifican de acuerdo a la forma en que se les induce diabetes (Arias, 2007).

- a) Espontáneos, son aquellos que se encuentran relativamente inalterados y se mantienen por cruces endogámicos, que proceden de un animal en el que surgió espontáneamente la diabetes o se hacen cruces selectivos favoreciendo algún rasgo fenotípico. De este grupo se dividen a su vez en 2:
 - Análogos, que son utilizados como sustitutos de la DM2, permitiendo conocer todos los aspectos involucrados en la enfermedad.
 - Intrínsecos, estos solo representan una parte de la enfermedad.
- b) Inducidos, aquí se reproducen en los animales experimentales una o más de las manifestaciones clínicas de la DM2, mediante diferentes métodos,

dentro de los que destacan: inducción hormonal, manipulación genética y administración de fármacos.

3.6.1 Modelo Estreptozotocina-Nicotinamina (STZ-NA)

El modelo STZ-NA es un modelo experimental de DM2 inducido; propuesto por Masiello *et al*, 1998. Su principal objetivo es que haya respuesta de las células β al administrar glucosa; así como respuesta a la administración de secretagogos de insulina como es el caso de las sulfonilureas. Este modelo se basa en la administración intraperitoneal (i.p.) de la nicotinamina (NA) y después de 15 min. la administración intravenosa (i.v.) de estreptozotocina (STZ).

Mecanismo de acción de la STZ

La STZ, es un antibiótico derivado de la fermentación *Streptomyces achromogenes*, cuya principal actividad es antitumoral y químicamente es análoga a otras nitrosoureas. Sin embargo es ampliamente utilizada para inducir hiperglucemia (Etuk, 2010).

Consta de dos fracciones, una glucosa, que le confiere afinidad por el GLUT2 y la fracción metil-nitrosourea, ésta alquila el ADN al transferirle un grupo metilo (Fig. 4). Para reparar el daño se activan mecanismos intracelulares como la sobreestimulación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), esta enzima utiliza como sustrato a la coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD^+), la cual es una molécula importante en el metabolismo de ATP, por lo que si NAD^+ disminuye también disminuirá el ATP en las células y por lo tanto la célula morirá. También hay gasto de ATP debido a que la STZ induce daño mitocondrial al disminuir la actividad de la aconitasa, reduce el consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial (Szkudelski, 2012).

Mecanismo de acción de la NA.

La NA es la forma amida de la vitamina B₃ (Fig. 4).

- Inhibición de PARP1, la cual es de origen competitivo, debido a que la NA bloquea la unión de NAD⁺ al dominio catalítico de la enzima.
- Suministro de NAD⁺, debido a que la NA es un precursor de NAD⁺ (Szkudelski, 2012).

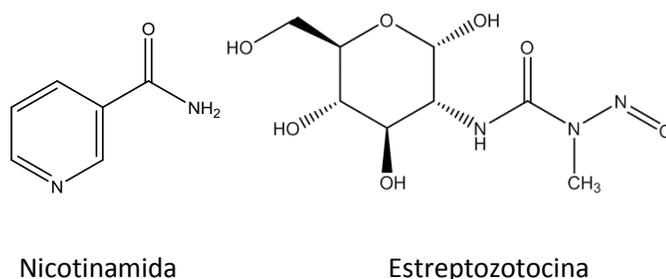


Figura 4. Estructura química de los fármacos utilizados para la inducción de hiperglucemia

3.7 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La fitoquímica es el estudio de los productos del metabolismo, primario y secundario, así como el aislamiento e identificación de los constituyentes de la misma (Hall, 1957).

Los metabolitos secundarios se dividen de acuerdo a su estructura química en tres principales familias: terpenos, fenoles y alcaloides; los cuales tienen propiedades biológicas como antioxidantes, antimicrobianos, estimulantes del sistema inmune, moduladores de hormonas del metabolismo, anticancerígenos, etc.

A través de estudios fitoquímicos se han descubierto y aislado nuevos compuestos útiles para el tratamiento de la DM2 (Saxena, *et al*, 2013).

La CCF es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas, debido a su rápida y fácil evaluación visual. Se ha convertido en un método ideal para el análisis de

extractos de plantas (Wagner *et al*, 1984), ya que permite determinar el número de compuestos en una mezcla, identificarlos y purificarlos (UMA, 2014).

El principio básico de la cromatografía consiste en una distribución desigual entre dos fases: estacionaria y móvil, de un determinado compuesto. Esto permite separar una mezcla en sus componentes de acuerdo a su polaridad en un sistema (Marcano y Hasegawa, 2002).

En la CCF la fase estacionaria más utilizada es el gel de sílice y la alúmina. El proceso de adsorción se debe a interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno; por lo cual la fase estacionaria debe ser inerte con las sustancias a analizar. Y el orden de elución se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil, la cual puede ser un disolvente o varios miscibles entres sí (UMA, 2014).

Para comparar las muestras es importante conocer el valor Rf, que es la relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen del punto de aplicación y es constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas determinadas (UMA, 2014).

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el eluyente}}$$

3.8 *Hamelia patens* Jacq.

Arbusto o árbol de hasta 3m de altura con hojas opuestas o agrupadas de 3 a 5. Flores tubulares rojas o naranjas, ubicadas en la parte terminal. Los frutos son globosos o alargados, de color rojo tornando a negro (Fig. 5) (BDMTM, 2009). Puede crecer en varios tipos de suelos, desde arcillas pesadas hasta de alta alcalinidad; sin embargo prefiere suelo arcilloso o areno-arcilloso (Ahmad *et al*, 2012).

Taxonomía

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida.

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Asteranae

Orden: Gentianales

Familia: Rubiaceae

Género: *Hamelia*

Nombre botánico: *Hamelia patens* Jacq.



Figura 5. Imagen de *Hamelia patens*. Tomada de BDMTM, 2009.

Distribución

Se distribuye del sur de los Estados Unidos hasta Argentina. (Fig. 6) (Conabio, 2009).

En México se encuentra en Campeche, Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán. En los diferentes estados es conocida como; balletilla, tochomite, trompetilla, coralillo, hierba coral, madura zapote y madura plátano (CONABIO, 2009; BDMTM, 2009).



Figura 6. Mapa de referencias donde se ha determinado la distribución de *H. patens*. Denotando verde intenso los lugares con más referencias y verde tenue los países con sólo pocas referencias. Tomado de www.tropicos.org 2015.

Usos en la medicina tradicional mexicana.

En la medicina tradicional mexicana tiene reportados 42 usos diferentes (Ahmad *et al*, 2012); entre los que destacan su uso como diurético, problemas de gastritis, anti-inflamatorios, diarrea, cáncer de estómago, desordenes ginecológicos, lesiones dermatológicas, anemia (Andrade-Cetto, 2009; Alonso *et al*. 2011); también ha sido reportada para el tratamiento de diabetes en los estados de Oaxaca, San Luis Potosí e Hidalgo (Alonso *et al*, 2012; Castro *et al*, 2014; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). El grupo de trabajo de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias reportó en 2012 que *H. patens* es utilizada para el tratamiento de la DM2 (Com. Pers. Isabel Escalante, 2012).

Uso en la comunidad

En las comunidades de Tlanchinol y San Salvador en Hidalgo, *H. patens* es utilizada para el tratamiento de la DM2.

Para ello el especialista en plantas Isabel Escalante recomienda hervir aproximadamente 20g de la parte aérea de la planta seca en 500 ml de agua y beberla durante el día como “agua de uso”.

Estudios fitoquímicos

En el extracto metanólico se han encontrado la presencia de alcaloides oxindoles pentacíclicos como la isopteropodina, rumberina, palmirina, maruquina, alcaloide A, B y C; entre otros compuestos están la apigenina, efedrina, flavononas, isomaruquina, narirutina, pteropodina, ácido rosmarínico, rutina, seneciofilina, especiofilina y taninos (Reyes *et al*, 2004; Ahmad *et al*, 2012). En el extracto etanólico se encontró; ácido caféico, ácido shikímico, ácido quínico, fitol, fitosterol, escualeno, ácido oleanólico y ácido ursólico (componente principal), mitrafilina y tocoferoles (Alonso *et al*, 2015).

Estudios sobre toxicidad

Alonso *et al*, 2015 realizó dos estudios de toxicidad del extracto etanólico en ratones:

Agudo; se usaron dos vías de administración; oral (v.o.), para el cuál no se observó ningún síntoma de toxicidad; e intraperitoneal (i.p.), en este caso a partir de la dosis de 2500mg/Kg se observó un déficit neurológico que incluía inmovilidad y sedación después de 4h de haber sido administrado, por lo cual se considera que hay una toxicidad moderada. En ninguno de los casos hubo cambio en el peso de los ratones, ni cambio aparente en los órganos.

Subagudo; se midieron parámetros hematológicos, donde se determinó que el extracto etanólico no produce anemia, cambios en los eritrocitos ni afecta la producción de hemoglobina; aunque hubo aumento en los leucocitos y neutrófilos, estuvo dentro de los límites fisiológicos; para el caso de los parámetros bioquímicos se observaron cambios en algunos, sin embargo, fueron mínimos, por lo que no se pudo diagnosticar falla renal o hepatotoxicidad.

4. Justificación

La DM2 se ha convertido en un gran problema de salud en México y en diversas comunidades la medicina tradicional juega un papel imprescindible para su tratamiento, por lo cual es importante conocer sobre la medicina tradicional y evaluar el efecto de las plantas utilizadas.

Se han realizado diversos estudios etnofarmacológicos en los que señalan a *H. patens* como una de las plantas utilizadas para el tratamiento de la DM2, por lo que es de suma importancia realizar estudios farmacológicos para iniciar la validación de su uso.

5. Objetivos

Objetivo general:

- Determinar si los extractos (acuoso e hidroalcohólico) de *H. patens* tienen efecto hipoglucemiante agudo en ratas STZ-NA.

Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *H. patens* a dos diferentes dosis en ratas STZ-NA
- .Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de *H. patens* a dos diferentes dosis en ratas STZ-NA
- Mediante la técnica de cromatografía en capa fina determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos (acuoso e hidroalcohólico) de *H. patens*.

6. Hipótesis

1. El extracto A de *H. patens* tiene efecto hipoglucemiante en ratas STZ-NA.
2. El extracto HA de *H. patens* tiene efecto hipoglucemiante en ratas STZ-NA.

7. Método

7.1 Colecta de *H. patens*

Se realizó en la carretera del municipio Tepehuacan de Guerrero, Hidalgo; colectándose la parte aérea de la planta (hojas, tallo, flores y frutos), de las cuales se seleccionaron 5 ejemplares para muestra de herbario.

Su identificación se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias, por el M. en C. Ramiro Cruz Durán. Los ejemplares fueron depositados en el Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el No de herbario 16172.

La parte aérea de la planta se colocó en una cámara de secado en el Laboratorio de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias, UNAM y posteriormente fue triturada para la elaboración de los extractos.

7.2 Obtención de extractos

Extracto Acuoso

Se calentaron 500ml de agua destilada en una parrilla de agitación, una vez que llegó a su punto de ebullición se agregaron 20g de la planta, se mantuvo a esta temperatura durante 15 minutos, posteriormente se filtró al vacío con tierra diatomácea J.T. Baker®. Se congeló a una temperatura de -40°C en un ultracongelador REVCO durante 24h y finalmente se secó en la liofilizadora LABCONCO® por aproximadamente 24h.

Extracto hidroalcohólico

Se utilizaron 250ml de agua destilada y 250ml de etanol, se le agregaron los 20g de planta y se mantuvo a una temperatura de 30 a 40°C en agitación durante 3h, el extracto se filtró al vacío con tierra diatomácea J.T. Baker®.

Al resto de la planta se le agregaron otros 250ml de agua destilada y 250ml de etanol, para realizar una segunda extracción, la cual también se filtró al vacío.

Ambas extracciones se colocaron en el rotavapor Büchi® para eliminar el etanol y la mayor cantidad de agua posible, lo que quedó se congeló a -40°C en el

ultracongelador REVCO durante 24h. Por último se colocó en la liofilizadora LABCONCO® aproximadamente durante 24h, obteniendo así el extracto seco.

7.3 Cálculo de la dosis y DER (Drug extract ratio)

Para determinar la dosis que se administró a las ratas, se pesó el extracto, el peso final se multiplicó por el peso inicial y se dividió entre 70 Kg, ya que es el peso promedio de una persona.

El DER es la relación de la masa del material vegetal inicial (droga herbal) con respecto a la masa del extracto resultante (preparación herbal); dándole valor =1 a la preparación herbal. Cabe señalar que el resultado es influenciado por el material vegetal utilizado, el solvente para la extracción, la forma de extracción y el equipo utilizado para la misma (Vlietinck *et al*, 2009).

$$DER = \frac{\text{Droga herbal}}{\text{Preparación herbal}} = x:1$$

7.4 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas WISTAR de ambos sexos con una edad de dos meses y pesos aproximados de 200 a 250 g, se mantuvieron en condiciones de bioterio con libre acceso a alimento y agua, a una temperatura de 20 a 25°C y un fotoperiodo 12/12.

7.5 Inducción de hiperglucemia mediante el modelo STZ-NA

El lote de ratas se dejó en ayuno de 12 horas y fue pesado para el cálculo de la dosis de STZ y NA a inyectar.

Un día antes de la inducción se preparó la STZ a una dosis de 65 mg/Kg, ésta fue disuelta en 1 ml/Kg de buffer de acetatos a un pH de 4.5. La NA se preparó el día de la inducción a una dosis de 150 mg/Kg, ésta se disolvió en 2 ml/Kg de solución fisiológica al 0.9%.

Se administraron 2 ml/Kg de NA vía intraperitoneal; pasando 15 minutos se administró 1 ml/Kg de STZ vía intravenosa.

7.6 Estudio farmacológico

1. Se formaron 7 grupos de 11 ratas cada uno: 1. Control Normoglucémico (CN), 2. Control Hiperglucémico (CH), 3. Hiperglucémico + Glibenclamida (H-G), 4. Hiperglucémico + Extracto acuoso dosis tradicional (H-A), 5. Hiperglucémico + Extracto acuoso dosis X10 (H-AX10), 6. Hiperglucémico + Extracto hidroalcohólico dosis tradicional (H-HA) y 7. Hiperglucémico + Extracto hidroalcohólico dosis x10 (H-HAX10), (Cuadro 3).

Cuadro 3. Grupos formados y tratamiento administrado.

Grupo	Tratamiento
1. CN	1.5ml de solución fisiológica (6 ♀ y 5 ♂)
2. CH	1.5ml de solución fisiológica (6 ♀ y 5 ♂)
3. H-G	5mg/Kg glibenclamida en 1.5 ml de solución fisiológica. (7 ♀ y 4 ♂)
4. H-A	30mg/Kg de extracto acuoso en 1.5 ml de solución fisiológica. (7 ♀ y 4 ♂)
5. H-AX10	300mg/Kg de extracto acuso en 1.5 ml de solución fisiológica. (5♀ y 6 ♂)
6. H-HA	60mg/Kg de extracto etanol-agua en 1.5ml de solución fisiológica. (5♀ y 6 ♂)
7. H-HAX10	600mg/Kg de extracto etanol-agua en 1.5ml de solución fisiológica. (5♀ y 6 ♂)

2. Para la medición de glucosa en sangre se utilizó el glucómetro Accutrend® Plus y las tiras reactivas Accutrend® Glucose. La muestra de sangre se obtuvo de la vena caudal de la rata ya que tiene menos terminaciones nerviosas. La glucemia se midió 60 minutos después de administrar el tratamiento, las mediciones siguientes se hicieron cada 60 min. durante 3 horas.

7.7 Estadística

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la prueba Tukey, considerando una $p < 0.05$ al cumplir con los criterios de homocedasticidad de varianza y distribución normal.

Se compararon el grupo CH con el CN.

Los grupos H-G, H-A, H-AX10, H-EA e H-EAX10 se compararon con respecto al CH para determinar si había diferencia significativa en el efecto hipoglucemiante.

Y para todos los grupos se realizó una prueba estadística para determinar si había diferencia significativa entre los tiempos con respecto al T0.

7.8 CCF

Se realizó para ambos extractos con el fin saber el tipo de compuestos presentes en cada extracto, usando diferentes fases móviles, en las que se pueden detectar flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados, terpenos, glicósidos y alcaloides.

Para todos los análisis de CCF se pesaron 5mg de ambos extractos y en la placa se aplicaron 10 μ l de cada extracto y 1 μ l de cada control.

Se utilizaron placas TLC sílica gel 60 F245 de 6 cm de largo por 5 cm de ancho para la identificación de flavonoides glicosilados y agliconas, y de 5 cm de largo por 4 cm de ancho para terpenos, alcaloides y glicósidos.

Para la identificación de **flavonoides agliconas** los extractos se disolvieron en 500 μ l de metanol, como controles se utilizaron quercetina (fig. 8) y ácido caféico (fig. 7). La fase móvil fue diclorometano: metanol (9:1) y el revelador utilizado fue el ácido difenilbourínico.

En el caso de los **flavonoides glicosilados** los extractos se disolvieron en 500 μ l de metanol y 200 μ l de agua, se usaron como controles rutina (fig. 10) y ácido clorogénico (fig. 9). La fase móvil fue acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (10:1.1:1.1:2.6) y el revelador utilizado fue el ácido difenilbourínico.

Para los **terpenos** los extractos se disolvieron en 500 µl de metanol y como control se utilizó timol. La fase móvil fue hexano: acetato de etilo (8.5:1.5) y el revelador utilizado fue vainillina (0.5g de vainillina en 50ml de ácido sulfúrico) y posteriormente se calentó en la parrilla.

Para la identificación de **glicósidos** se disolvieron los extractos en 500 µl de metanol y 100 µl de agua, se usaron como controles sacarosa y glucosa. Como fase móvil se usó propanol: acetato de etilo: agua: ácido acético (4:3.5:1.5:1) y se reveló con sulfato cérico (22 ml de ácido sulfúrico, 350 g de hielo y 16 g de sulfato cérico).

Finalmente para identificar **alcaloides** los extractos se disolvieron en 500 µl de metanol, el control utilizado fue quinina. La fase móvil fue diclorometano: metanol: hidróxido de amonio al 25% (8.5:1.4:0.1) y el revelador utilizado fue Dragendorff: solución 1 (0.85g de nitrato de bismuto básico en 40ml de agua destilada y 10ml de ácido acético al 99%) y solución 2 (2.8g de ioduro de potasio en 20ml de agua destilada).

- ❖ Las placas de flavonoides glicosilados y agliconas se analizaron con el software VideoScan® (CAMAG). El cual consiste en convertir imágenes digitalizadas de CCF en curvas análogas basadas en la absorbancia o fluorescencia de las bandas separadas.

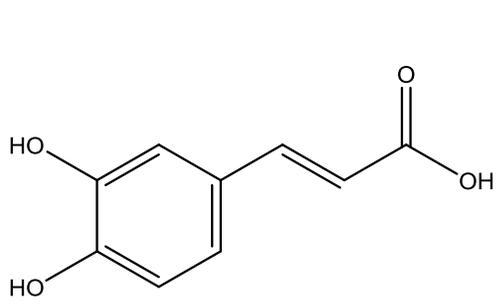


Figura 7. Ácido caféico

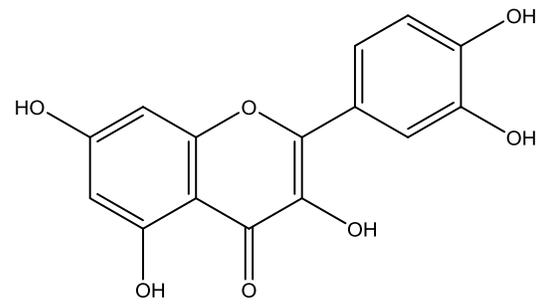


Figura 8. Quercetina

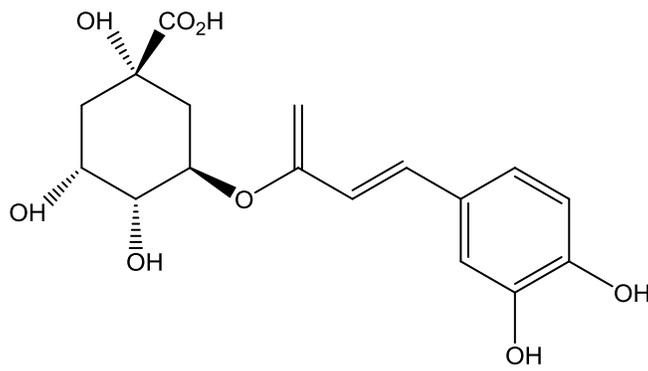


Figura 9. Ácido clorogénico

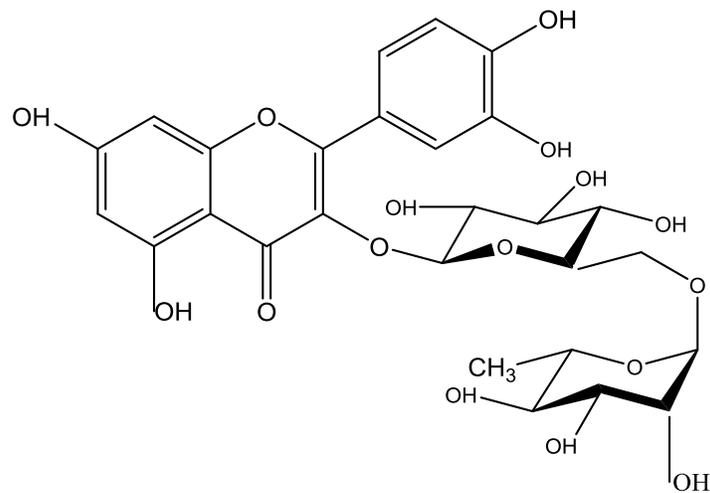


Figura 10. Rutina

8. Resultados

8.1 Cálculo DER

El extracto hidroalcohólico tuvo mayor rendimiento que el extracto acuoso, ya que se requirieron menos partes de la droga herbal para una parte de la preparación herbal (Cuadro 4).

Cuadro 4. Rendimiento de cada extracto de acuerdo con el DER.

Extracto	Droga herbal	Preparación herbal	Rendimiento
Acuoso	20 g	2.097	10:1
Hidroalcohólico	20 g	3.962	5:1

8.2 Estudio farmacológico

De acuerdo con los resultados en el estudio farmacológico el grupo CH muestra diferencia significativa en todos los tiempos con respecto al CN. El grupo H-G tiene una respuesta hipoglucemiante a partir del T60 y se observa diferencia significativa a partir del mismo tiempo (Cuadro 5).

En el caso del grupo H-A y del H-AX10 se observa diferencia significativa a partir del T120 con respecto al CH y con respecto a sus T0, y el efecto se ve aumentado en el T180.

En los grupos H-HA y H-HAX10 el efecto hipoglucemiante con diferencia significativa se dio a partir del T60 con respecto a su T0 y al grupo CH, y este efecto se vio en aumento en los siguientes dos tiempos.

Cuadro 5. Media de cada tiempo de los diferentes grupos, así como el error estándar. “1” representa diferencia significativa (ds) entre el grupo CH con respecto al CN; “2” indica la ds de los grupos H-G, H-A, H-AX10, H-HA y H-HAX10 con respecto al CH y “a” denota ds entre los diferentes tiempos de cada grupo con respecto a su T0.

Grupos	T0	T60	T120	T180
1. CN	125 ± 2	131 ± 4	126 ± 2	124 ± 3
2. CH	197 ± 7 ¹	188 ± 9 ¹	189 ± 11 ¹	194 ± 10 ¹
3. H-G	203 ± 9	153 ± 11 ^{2,a}	124 ± 5 ^{2,a}	112 ± 4 ^{2,a}
4. H-A	202 ± 4	190 ± 10	161 ± 8 ^{2,a}	152 ± 4 ^{2,a}
5. H-AX10	201 ± 5	187 ± 6	163 ± 5 ^{2,a}	151 ± 5 ^{2,a}
6. H-HA.	191 ± 5	164 ± 6 ^{2,a}	149 ± 3 ^{2,a}	137 ± 2 ^{2,a}
7. H-HAX10	188 ± 3	163 ± 3 ^{2,a}	153 ± 5 ^{2,a}	144 ± 3 ^{2,a}

En la figura 11. se observan de forma gráfica los datos mostrados en el cuadro 6. De esta forma se muestra que el grupo CN mantiene los niveles de glucemia durante todo el experimento, al igual que el CH muestra hiperglucemia sin diferencia significativa en todos los tiempos. También se aprecia que el comportamiento de los grupos experimentales H-A y H-AX10 es muy similar. El grupo H-HA en el último tiempo tiene valores más bajos de glucemia que el H-HAX10, sin embargo no hay diferencia significativa entre éstos.

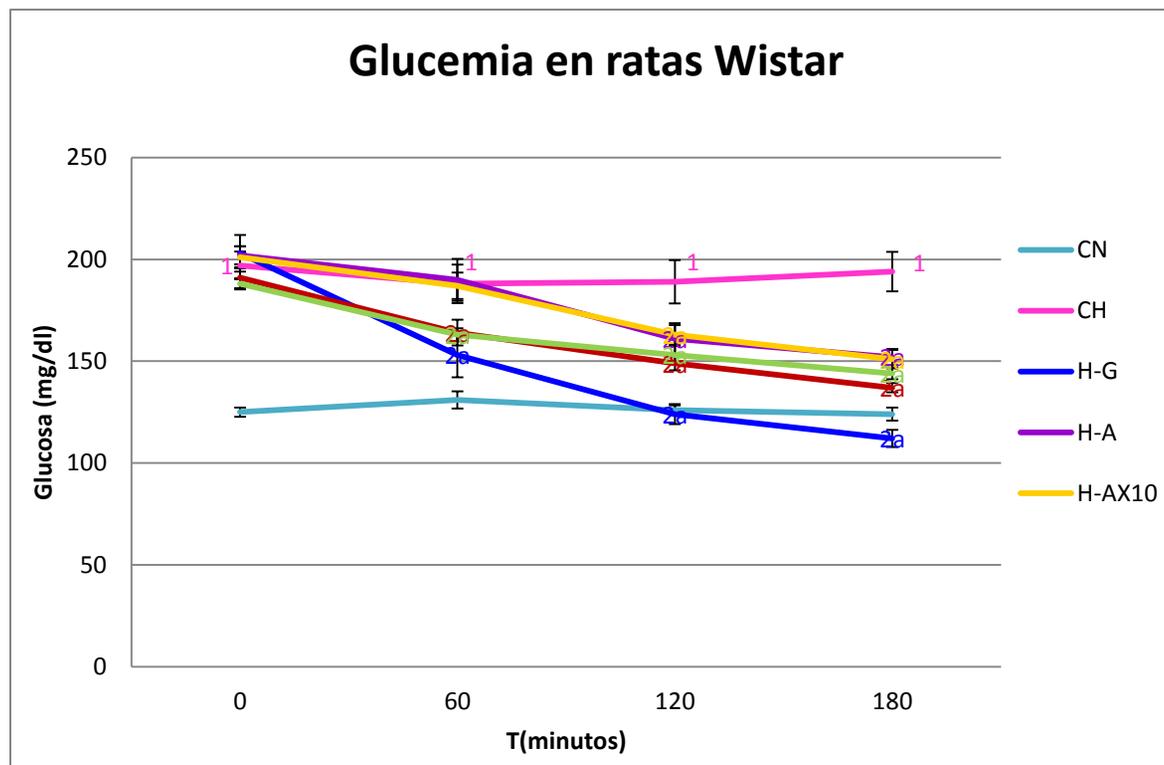


Figura 11. Gráfica de las medias de glucemia de cada tiempo de los grupos con su respectivo tratamiento. "1" representa diferencia significativa (ds) entre el grupo CH con respecto al CN; "2" indica la ds de los grupos H-G, H-A, H-AX10, H-HA y H-HAX10 con respecto al CH y "a" denota ds entre los diferentes tiempos de cada grupo con respecto a su T0.

8.3 CCF

En el cuadro 6 se observan el número de bandas identificadas en la CCF de los grupos de metabolitos secundarios detectados o no en los extractos HA y A de *H. patens* y en las siguientes figuras se aprecian las fotos de las placas realizadas.

Cuadro 6. Número de bandas detectadas en CCF para las diferentes pruebas de metabolitos secundarios los extractos HA y A de *H. patens*.

Extractos	Flavonoides agliconas	Flavonoides glicosilados	Terpenos	Alcaloides	Glicósidos
Acuoso	5	4	1	-	1
Hidroalcohólico	13	7	3	-	1

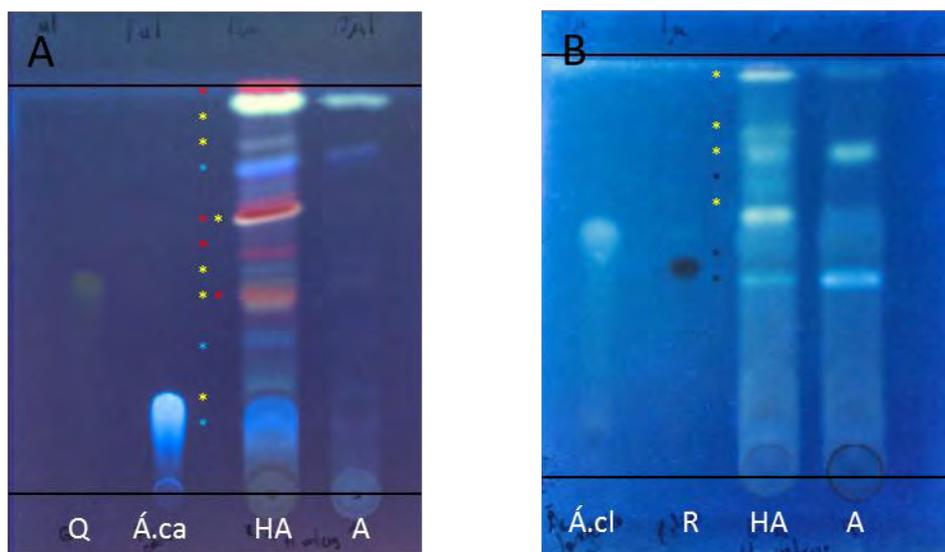


Figura 12. Imagen A: Flavonoides agliconas, donde Q es quercetina y Á.ca es ácido cafeico. Imagen B: Flavonoides agliconas, donde Á.cl es ácido clorogénico y R rutina. En ambas imágenes HA es extracto hidroalcohólico y A extracto acuoso.

En la imagen A se observa la presencia de Q y Á.ca, sin embargo, en el extracto E-A parece haber mayor concentración de los dos. También se observan otros compuestos fenólicos (bandas amarillas y azules). En la imagen B se observa la presencia de Á.cl. en ambos extractos.

El perfil cromatográfico de las placas de flavonoides glicosilados y agliconas se muestra en el ANEXO 1 tabla 1 y figura 2. En la tabla 1.se observa que el valor Rf de los controles (quercetina, ácido cafeico y ácido clorogénico) corresponde al de los compuestos encontrados en el extracto HA y el de (quercetina y ácido clorogénico) al de los detectados en el extracto A. La figura 2A) muestra la presencia de quercetina en ambos extractos y que el ácido cafeico es un compuesto abundante en el extracto HA y en la figura 2B) se identifica que el ácido clorogénico es el compuesto más abundante en el extracto HA mientras que en el extracto A es el segundo más abundante.

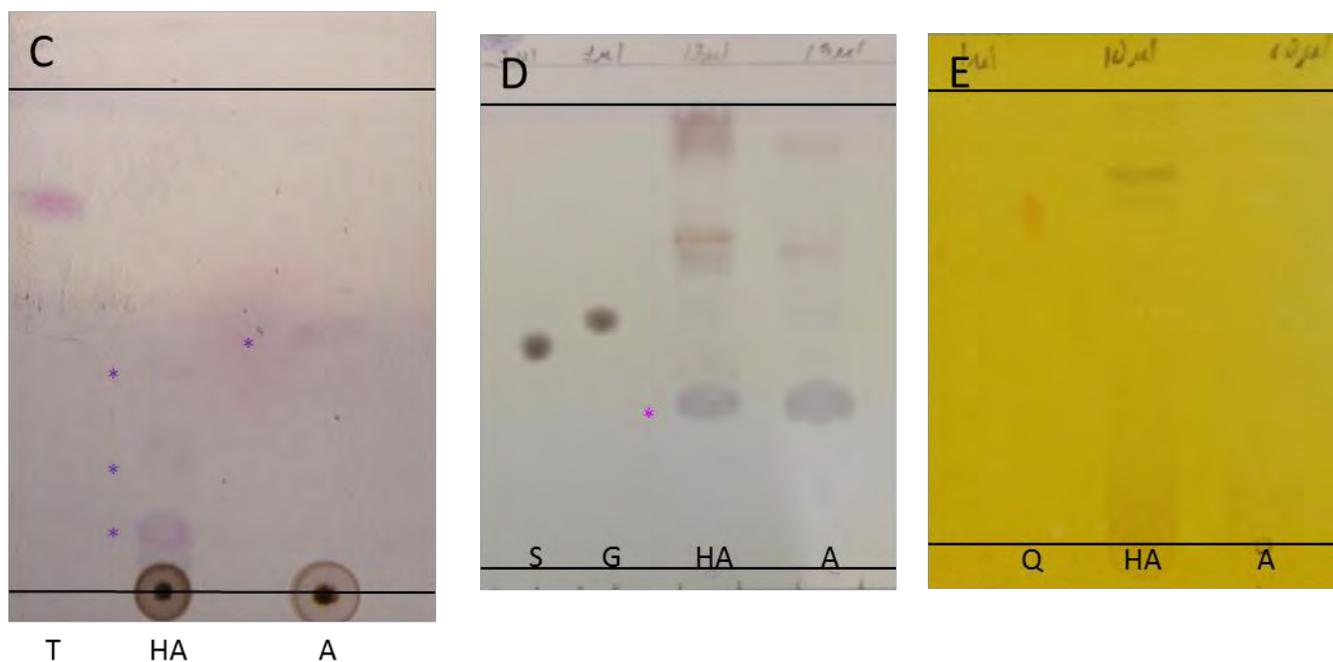


Figura 13. Imagen C placa para la detección de terpenos donde T es timol y (*) señala la presencia de terpenos en los extractos. Imagen D placa para detección de glicósidos donde S es sacarosa y G glucosa y (*) señala la banda que indica presencia de glicósidos. Imagen E placa para detectar Alcaloides donde Q es quinina. Para las tres placas HA es extracto hidroalcohólico y A extracto acuoso

En la imagen C se observan 3 bandas de terpenos en el extracto HA y una en el A. En la imagen D se observa que en ambos extractos se encuentra el mismo glicósido. En la Imagen E no se detectaron alcaloides en ningún extracto.

8. Discusión

La DM2 es una enfermedad crónica que se ha convertido en un grave problema de salud en México, por lo que se deben buscar nuevas alternativas al tratamiento ya conocido y una forma es el estudio de la medicina tradicional, ya que estudios etnofarmacológicos han tenido mayor eficiencia que los de bioprospección (Marles y Farnsworth, 1995). De acuerdo con Andrade-Cetto y Heinrich 2005 hay alrededor de 306 especies de plantas utilizadas en México para el tratamiento de la DM2; sin embargo no se ha reemplazado el uso de fármacos, ya que solo muy pocas de éstas tienen estudios científicos; sin mencionar el costo del financiamiento y el tiempo requerido para tener los estudios necesarios para la regulación de acuerdo a la FDA (Food and Drug Administration) (Marles y Farnsworth, 1995).

H. patens ha sido mencionada en diversos estudios para el tratamiento de la DM2 en la medicina tradicional mexicana, por lo que en este trabajo se inicia su estudio farmacológico.

Los modelos animales tienen un papel muy importante en la evaluación de nuevos fármacos, en el caso de este estudio se utilizó el modelo STZ-NA propuesto por Masiello en 1998. Se indujo hiperglucemia a ratas Wistar y al comparar el grupo CN con el CH se determinó que hay diferencia significativa en todos los tiempos, lo cual nos indica que la STZ tiene un efecto citotóxico en las células β pancreáticas; así mismo al comparar el grupo CH y el H-G se observa que la glibenclamida tiene efecto hipoglucemiante a partir del T60, lo que nos dice que hay secreción de insulina, que se debe al efecto citoprotector de la NA.

En todos los grupos experimentales se observó una disminución en la glucemia basal; a pesar de que se administraron dos dosis diferentes de ambos extractos

no se observó un mayor efecto hipoglucemiante con la dosis alta, lo cual puede deberse a que la absorción no haya sido completada durante los tiempos de medición de la glucemia.

A lo largo de la historia diferentes compuestos se han aislado por su efecto hipoglucemiante, entre los que destacan; mucilagos, glicósidos y proteínas. En menor proporción también se han identificado flavonoides, esteroides, triterpenos y alcaloides (Pérez G.R.M, *et al*, 1998). En este trabajo se realizó CCF para determinar si los extractos contienen alcaloides, flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados, terpenos y glicósidos; de los cuales el único con resultado negativo fue la CCF de alcaloides (Fig. 13, imagen E). En cuanto a la placa realizada para la detección de terpenos (Fig. 13, imagen C) se observa que hay presencia en ambos extractos, sin embargo por lo tenue de las bandas se cree que hay muy poca concentración de éstos. En el caso de los glicósidos (Fig. 13, imagen D) se observa una gran banda que tiene el mismo valor Rf para los dos extractos; sería interesante poder identificarlo y determinar si tiene un papel importante en el efecto hipoglucemiante de *H. patens*, ya que como se ha mencionado los glicósidos son de los grupos que con mayor frecuencia se encuentran con dicho efecto.

La CCF es una herramienta sencilla y rápida que permite determinar si dos muestras presentan el mismo compuesto, lo cual se realiza al comparar el valor de Rf de las bandas de interés (UMA, 2014). De acuerdo con los resultados obtenidos en la CCF de flavonoides agliconas (Fig. 12, imagen A) se observa la posible presencia de quercetina, ácido cafeico, y en el caso de la placa para flavonoides glicosilados (Fig. 12, imagen B) la de ácido clorogénico en ambos extractos; para confirmarlo se utilizó el software VideoScan® (CAMAG) para obtener el perfil cromatográfico de cada uno de los extractos (HA y A) y controles (ácido clorogénico, quercetina y ácido cafeico) a partir de las fotos de las placas de flavonoides glicosilados y agliconas con el fin de calcular su Rf y compararlos entre sí (Ver ANEXO 1 tabla 1 y figura 1.); siendo este un método sencillo y funcional como herramienta para demostrar la presencia de ácido clorogénico,

quercetina y ácido cafeico en el extracto HA y la de quercetina y ácido clorogénico en el extracto A, así como también para comparar cualitativamente las proporciones de los compuestos estudiados en cada extracto (Ver ANEXO 1 figura 2.). La rutina es uno de los compuestos que se encuentra presente en *H. patens* (Ahmad *et al*, 2012); sin embargo en el caso de este trabajo no se pudo determinar con el control utilizado.

Cabe destacar que el ácido clorogénico, la rutina y la quercetina tienen estudios farmacológicos en los que se comprueba su efecto hipoglucemiante (Kamalakkannan y Mainzen, 2006; Torres-Piedra M. *et al*, 2010; WeiOng K. *et al*, 2013).

El ácido clorogénico actúa inhibiendo a la enzima (G6P), que es clave en la glucogenólisis y gluconeogénesis. Estudios recientes también han demostrado que tras administrar vía intraperitoneal durante dos semanas el ácido clorogénico estimula la entrada de glucosa al músculo esquelético a través de la activación de AMPK aumentando la expresión y traslocación del GLUT 4 (WeiOng K. *et al*, 2013).

La rutina es un flavonoide glicosilado que al ser administrado de forma crónica en ratas STZ ha mostrado tener un efecto hipoglucemiante al disminuir el consumo de alimento. Por su capacidad antioxidante elimina radicales libres e inhibe la peroxidación de lípidos lo cual es de gran importancia porque previene el estrés oxidativo y protege a las células β ; también se observó un aumento en la secreción de insulina y disminuyó la HbA1c (Kamalakkannan y Mainzen, 2006).

De acuerdo a estudios realizados por Torres-Piedra M. *et al*, 2010 se determinó que uno de los mecanismos de acción de la quercetina es mediante la inhibición de la enzima 11 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) que se encarga de mediar a la hormona glucocorticoide; los glucocorticoides son antagonistas de la insulina y promotores de la gluconeogénesis. También en un estudio subagudo se observó disminución de colesterol, triglicéridos, colesterol LDL y un aumento significativo de colesterol HDL.

Continuando con el análisis del efecto hipoglucemiante en la figura 12 se observa que en el grupo H-A la disminución significativa de glucemia es a partir del T120, por lo cual se sugiere que no es el aumento en la secreción de insulina lo que desencadena el efecto hipoglucemiante y se propone que el ácido clorogénico es el que actúa en mayor proporción al inhibir a la glucogenólisis. En el caso del grupo H-HA el efecto hipoglucemiante con significancia inicia a partir del T60, lo que nos dice que además del ácido clorogénico hay uno o más compuestos actuando en este grupo.

Finalmente los compuestos fenólicos también son importantes debido a sus propiedades antioxidantes, así además de controlar la hiperglucemia, también estarían disminuyendo el desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares que han sido ligadas al estrés oxidativo (Andrede- Cetto y Heinrich, 2005).

10. Conclusiones

Con este trabajo podemos concluir que los extractos A y E-A de *H. patens* tienen efecto hipoglucemiante en un estudio agudo; obteniendo mejores resultados con el extracto E-A. Sin embargo, ninguno presentó una relación dosis- respuesta durante las tres horas de medición, por lo cual se propone alargar el tiempo de medición o se aumente la dosis.

En las pruebas de CCF se identificó la presencia de glicósidos, terpenos, flavonoides agliconas y flavonoides glicosilados. En general los compuestos fenólicos fueron los que se encontraron con mayor diversidad; siendo el extracto E-A el que presentó mayor cantidad de compuestos. Los alcaloides no se pudieron identificar, pero se sugiere utilizar una extracción alcaloídica para poder dilucidar su presencia o no en estos extractos.

Con el perfil cromatográfico realizado a las placas de flavonoides glicosilados y agliconas se logró confirmar la presencia de quercetina, ácido cafeico y ácido clorogénico en el extracto E-A y la de quercetina y ácido clorogénico en el extracto A.

Se propone realizar otros estudios fitoquímicos y farmacológicos que ayuden a determinar el o los mecanismos de acción de la planta, así como estudios crónicos para la evaluación de la toxicidad y validar el uso de *H. patens* en la medicina tradicional mexicana como coadyuvante en el tratamiento de la DM2.

11. Referencias

- American Diabetes Association (ADA). (2013). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 36.
- Aguilar-Salinas C.A. (2008). SAM Diabetes. Libro 2: Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 y de la resistencia a la insulina. Intersistemas. México, D.F.
- Ahmad A, Pandurangan A, Singh N. y Ananad P. (2012). A mini review on chemistry and biology of *Hamelia patens* (Rubiaceae). *Pharmacognosy Journal*. 4(29): 1-4.
- Alonso-Castro A.J, Villarreal M.L, Salazar-Olivo L.A, Gómez-Sánchez M, Domínguez F. y García-Carranca A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 133 945-972.
- Alonso-Castro A.J, Maldonado M.J.J, Zarate M.A, JacoboS.M.R, Fernández G.C, Figueroa Z.L.A, Rios R.N.A, León R.M.A, Medellín C.N.A, Reyes M.A, Méndez M.R. y Carranza A.C. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 143 292-298.
- Alonso-Castro A.J, Ramos B.S, Hernández MA, Zapata M.J.R, González Ch.M.M. y Carranza A.C. (2015). Toxicity and antinociceptive effects of *Hamelia patens*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 25 170-176.
- Álvarez S.E, González C.T.M, Cabrera R.E, Conesa G.A.I, Parlá S.J. y González P.E.A. (2009). Algunos aspectos de actualidad sobre la hemoglobina glucosilada y sus aplicaciones. *Revista cubana de Endocrinología*, 20 (3).
- Andrade-Cetto A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*. p: 163-171.
- Andrade-Cetto A. y Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. (99) 325-348.
- Andrade-Cetto y Heinrich M. (2011). From the field into the lab: useful approaches to selecting species based on local knowledge. *Frontiers in Pharmacology*. 2 (20): 2-5.
- Asociación Nacional de Cardiólogos de México. (ANCM). (1999). Consenso mexicano de resistencia a la insulina y síndrome metabólico. *Revista Mexicana de cardiología*. 10 (1) p: 3-19.

- Arias Díaz J. y Balibrea J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*. 22(2) p: 160-168.
- Biblioteca Digital de Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). (2009). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Página en red: www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx. Consultada en noviembre de 2014.
- Bilbao J.R, Busturia M.A, Casamitjana R. y Castaño L. (2000). Autoanticuerpos anti-GAD65 y anti-IA-2 en diabetes tipo 1: valoración de kits comerciales para su detección. *Av Diabetol*.16. p: 233:238.
- Briskin Donald P. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*. Vol 124: 507-514.
- Byrne M.M, Sturis J, Cavaghan M, O'Meara N.M, Polonsky K.S. (2004). Secreción de insulina en el ser humano. En: LeRoith D, Taylor S.I. y Olefsky J.M. *Diabetes mellitus, texto básico y clínico*. 2da edición. Mc Graw Hill.
- Castro J.C.J, Villa R.N, Ramírez G.S.A. y Mosso G.C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas medicinales*. 19(1) p: 101-120.
- Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI). Medicina tradicional indígena. Página en red: cdi.gob.mx. consultada en noviembre de 2015.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2009). Ficha informativa Rubiaceae *Hamelia patens* Jacq. Página en red: www.conabio.gob.mx. Consultada en octubre de 2014.
- Donnelly R, Emslie-Smith A.M, Gardner I.D. y Morris A.D. (2000). Vascular complications of diabetes. *BMJ*. 320 p: 1062-1066.
- Duez H. y Lewis G.F. (2008). Fat metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes. En: Feinglos M.N y Bethel M.A. *Type 2 diabetes mellitus, an evidence-based approach to practical management*. Humana Press. p: 49-74.
- Etuk E.U. (2010). Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America* 1(2) p: 130-134.
- Federación internacional de Diabetes (FID). (2013). Atlas de la diabetes de la FID. Sexta edición.
- Federación Internacional de Diabetes (FID). (2015). Atlas de la diabetes de la FID. Séptima edición.

- Galbo H. y Richter E.A. (2004). Exercise. En: DeFronzo A.R, Ferrannini E, Keen H, Zimmet Paul. International Textbook of Diabetes Mellitus. 3era edición. John Wiley&Sons Ltd. p: 771-774.
- García L.C, Pérez H.B.E, Martínez H.A. y Castro B.F. (2009). Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes. Revista Chapingo serie zonas áridas. p: 229:239
- Habener Joel F. (2004). Péptidos insulíntrópicos semejantes al glucagón. En: LeRoith D, Taylor S.I. y Olefsky J.M. Diabetes mellitus, texto básico y clínico. 2da edición. Mc Graw Hill. p: 117-130.
- Hall J.A. (1957). A system of structural relationships in phytochemistry. Chemical Reviews. 20(3) p: 305-344
- Heinrich M. (2014). Ethnopharmacology: quo vadis? Challenges for the future. Revista Brasileira de Farmacognosia. 24.p: 99-102
- Hernández A.M, Gutiérrez J.P, Reynoso-Noverón N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. Salud pública de México. 55(2): S129-S136.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2013). Día mundial de la diabetes.
- Kamalakkannan N. y Mainzen P.P.S. (2006). Antyperglycaemic and antioxidant effect of rutine, a polyphenolic flavonoid, in Streptozotocin-induced diabetic Wistarrats. Pharmacology and Toxicology, 98. p: 97-103.
- Kaufer H. M. (2014). Alimentación para la prevención y control de la diabetes. Ponencia del foro “Cambio de estilo de vida para la prevención y control de la diabetes. Federación Mexicana de Diabetes. Página en red: <http://www.fmdiabetes.org>. Consultada en agosto 2015.
- Leahy J.L. (2008). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. En: Feinglos M.N y Bethel M.A. Type 2 diabetes mellitus, an evidence-based approach to practical management. Humana Press. p: 17-34.
- Lebovitz H.E. y Melander A. (2004). Sulfonylureas: Basic Aspects and Clinical Uses. En: DeFronzo A.R, Ferrannini E, Keen H, Zimmet Paul. International Textbook of Diabetes Mellitus. 3era edición. John Wiley&Sons Ltd. p: 801-825.
- López Luengo M.T. (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante: características, administración y efectos adversos. *Offarm: Farmacia y Sociedad*. 25 (5) p: 82-88.

- Marcano D. y Hasegawa M. (2002). Fitoquímica orgánica. Segunda edición. Torino. p: 61-69.
- Marles R.J. y Farnsworth N.R. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. 2 (2): 137-189.
- Massiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, Novelli M y Ribes G. (1998) Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 47 p: 224-229.
- Muoio D.M, Koves T.R, AnJie y Newgard C.B. (2008). Metabolic mechanisms of muscle insulin resistance. En: Feinglos M.N y Bethel M.A. Type 2 diabetes mellitus, an evidence-based approach to practical management. Humana Press. p: 35-48.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Página en red: <http://www.who.org>. Consultada en septiembre 2015.
- OMS. (2014). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. p: 15 y 16.
- Pérez-Aguilar F. (2005). Etiopatogenia de la esteatohepatitis no alcohólica. *Gastroenterol Hepatol*. 28 (7): 396-406.
- Pérez G.R.M, Zavala S.M.A, Pérez G.S. y Pérez G.C. (1998). Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicine*. 5 (1): 55-75.
- Reyes C.R, Rivera J, Oropeza M, Mendoza P, Amekraz B, Jankowski C. y Campos M. (2004). Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in Rat Myometrium. *Biol Pharm Bull*. 27(10):1617-1620.
- Saxena M, Saxena J, Nema R, Sing D. y Gupta A. (2013). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1(6): 168-182.
- Steyn N.P. y Levitt N.S. (2004). Dietary management of Diabetes mellitus in Sub-Saharan Africa. En: DeFronzo A.R, Ferrannini E, Keen H, Zimmet Paul. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3era edición. John Wiley&Sons Ltd. p: 759-769.
- Szkudelski. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*. p:481-490.
- The International Expert Committee (IEC). (2009). International expert committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 32 (7): 1327-1334.

- Torres- Piedra M, Ortiz- Andrade R, Villalobos-Molina R, Narender S, Medina-Franco J.L, Webster S.P, Binnie M, Navarrete Vázquez G. y Estrada Soto S. (2010). A comparative of flavonoid analogues on streptozotocin- nicotinamide induced rats: -quercetin as a potencial antidiabetic agent acting via 11 β -Hidroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45 p: 2606-2612.
- University of Massachusetts Amherts (UMA). (2014). Thin layer chromatography. Página en red: www.chem.umass.edu/~samal/269/tlc.pdf. Consultada en enero de 2016.
- Utzschneider K.M, Porte D, Jr., y Kahn S.E. (2004). Normal insulin secretion in humans. En: DeFronzo A.R, Ferrannini E, Keen H, Zimmet Paul. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3era edición. John Wiley&Sons Ltd. p: 139-147.
- Vázquez Ch.C, Villaseñor R.A. y Gutiérrez G.R. (2005). *SAM Diabetes*. Segunda edición. Intersistemas. México, D.F.
- Vlietinck A, Pieters L, y Apers S. (2009). Legal requeriments for the quality of herbal substances and herbal preparations for the manufacturing of herbal medicinal products in the European Union. *Planta medica*. 75: 683-688.
- Wagner H, Blatt S. y Zgainski E.M. (1984) *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography atlas*. Springer-Verlag.
- WeiOng K, -Hsu A. y Huat Tan B.K. (2013). Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*. 85: 1341-1351.
- Wollheim C.B. y Maechler P. (2004). β cell biology of insulin secretion. En:DeFronzo A.R, Ferrannini E, Keen H, Zimmet Paul. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3era edición. John Wiley&SonsLtd. p: 127-135.
- Zamora M. (2012) *Fisiopatología de la diabetes mellitus 2*. Página en red: <http://sgm.issste.gob.mx>. Consultada en noviembre de 2015.

Anexo 1

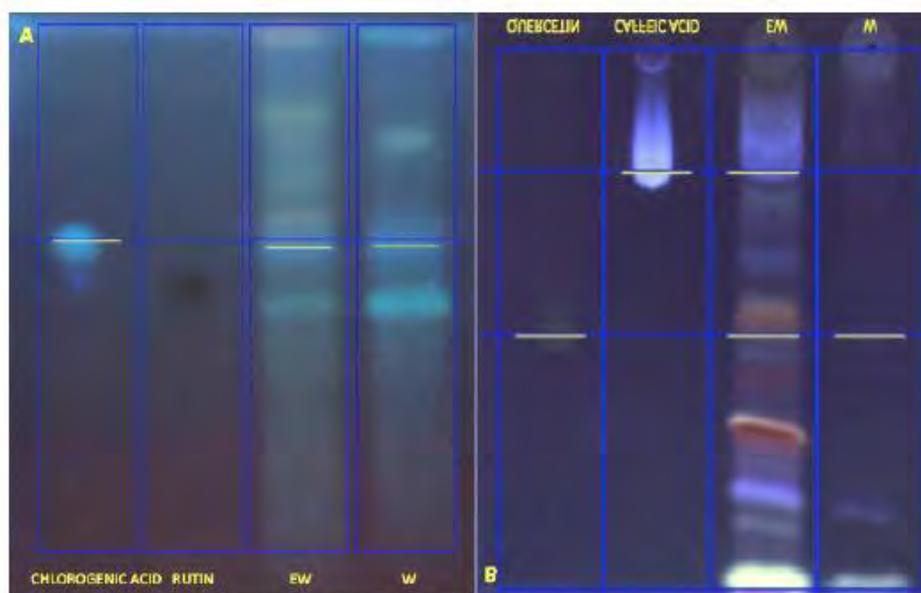


Figura 1. CCF. A) Flavonoides glicosilados de *H. patens*. Fase móvil: acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (68:7:7:18). B) Flavonoides agliconas. Fase móvil: diclorometano: metanol (9:1).

Cuadro 1. Comparación de los controles y las bandas detectadas en los extractos.

STANDARD	R _f calculated	E extract	W extract
Caffeic acid	0.260	0.251	-
Quercetin	0,568	0.550	0.568
Chlorogenic Acid	0.624	0.614	0.617

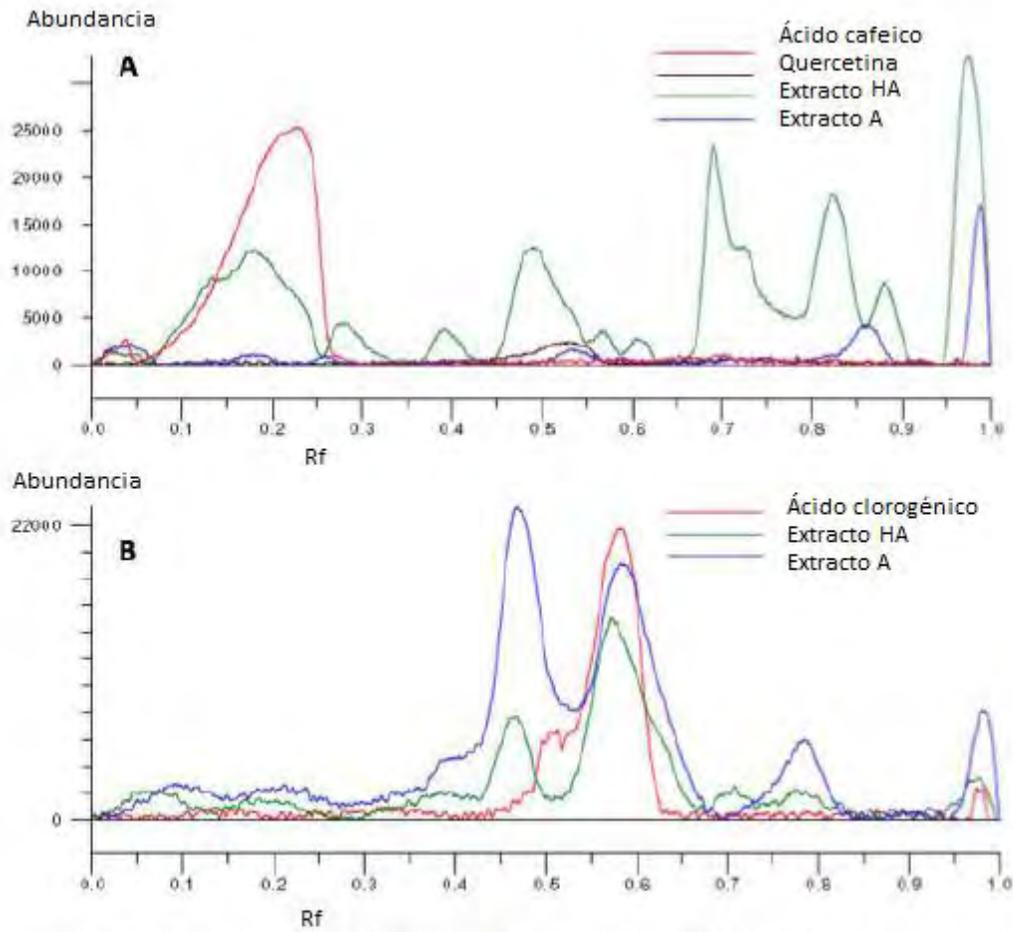


Figura 2. Perfil cromatográfico de los controles y extractos. A) Ácido cafeico, quercetina, extracto HA y extracto A. B) Ácido clorogénico, extracto HA y extracto A.