



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. Y *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. SOBRE LA ACTIVIDAD *IN VIVO* E *IN VITRO* DE LAS ALFA-GLUCOSIDASAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ALEJANDRA YVETTE RAMOS TORRES



DIRECTOR DE TESIS:
DR. ADOLFO ANDRADE CETTO

2018

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



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.

Ramos
Torres
Alejandra Yvette
59 71 33 88
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310261971

2. Datos del tutor.

Dr
Andrade
Cetto
Adolfo

3. Datos del sinodal 1

Dra
Mata
Essayag
Rachel

4. Datos del sinodal 2

Dr
Cárdenas
Vázquez
René de Jesús

5. Datos del sinodal 3

Dra
Escandón
Rivera
Sonia Marlen

6. Datos del sinodal 4

Biól
Cabello
Hernández
Christian Alan

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación del efecto de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. y *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. sobre la actividad in vivo e in vitro de las alfa-glucosidasas
74p.
2018

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de haberme formado profesional y personalmente dentro de sus instalaciones, por brindarme educación de calidad y oportunidades de aprendizaje académico y cultural inigualables.

A la DGAPA PAPIIT (Proyecto IN 228216) por los recursos aportados para que la realización de este trabajo fuera posible.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, por aceptarme en su laboratorio y equipo de trabajo, por haberme confiado la realización de este proyecto, por las aportaciones académicas tan valiosas que realizó para este trabajo, así como para mi crecimiento profesional; y sobre todo, por haberme auxiliado siempre que lo necesité.

A la Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera, por toda la ayuda académica y personal que me brindó desde mi primer día en el laboratorio, por aceptarme a trabajar con ella y por haberme enseñado y ayudado tanto durante ese tiempo. También gracias por la revisión y las aportaciones que permitieron el enriquecimiento y la mejora de este trabajo.

De igual forma a la Dra. Rachel Mata Essayag y al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, por los comentarios y revisiones que realizaron al presente trabajo para enriquecerlo.

Finalmente, y de una manera muy especial, al Biól. Christian Alan Cabello Hernández, a la M. en C. Fernanda Artemisa Espinosa Hernández y al M. en C. Gerardo Mata Torres Valle, ya que sin su ayuda este proyecto no hubiera sido posible. Gracias por ser mis mentores, por enseñarme las técnicas empleadas de una manera siempre profesional y paciente, pero sobre todo gracias por siempre velar por la realización de este trabajo, por cuidar que siempre hubiera lo necesario en el laboratorio para trabajar y por siempre ser un apoyo hasta el último momento en el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis papás, Rosa y Eliud, por ser los dos pilares más importantes en mi vida, por apoyarme desde siempre en todos los aspectos, por ser un ejemplo de trabajo duro y por nunca dudar de mí, por apoyarme en todos mis proyectos académicos y personales, por siempre darme todo lo que necesito. Aquí incluyo también a mi hermano menor, Eliud, quien es un ejemplo de esfuerzo constante y de responsabilidad con aquello que amamos, así como de humildad.

A mi familia, mis abuelitos Esperanza y Andrés, por ser el ejemplo de amor de toda la familia y por siempre cuidar de todos y preocuparse por nuestro bienestar. A mis tíos y primos, en especial a Karen y Emilio, que han sido siempre mis hermanos y con quienes he vivido muchos de los mejores momentos de mi vida.

A Eduardo Castro, mi novio, por ser una de mis mayores motivaciones durante este proceso y por siempre impulsarme a dar lo mejor de mí. Gracias por siempre confiar en mí y apoyarme en todo momento, por ser un soporte indispensable en mi vida y por la paciencia que siempre has tenido conmigo, pero sobre todo gracias por ser mi ejemplo de esfuerzo, superación y éxito, gracias por enseñarme a siempre querer alcanzar metas más grandes.

Gracias también a los amigos que me adoptaron desde el primer día que me conocieron, amigos inigualables y para toda la vida, computólogos (Emmanuel, Fernando y Diego), matemáticos (Uzziel), actuarios (Ulises, Mel y Elsa) y físicos (Álvaro y Fabián), gracias por toda la ayuda que me brindaron durante toda la carrera, por aceptarme en su grupo aunque fuera bióloga y por enseñarme tanto, pero sobre todo gracias por los momentos tan divertidos e inolvidables que he vivido y que sigo viviendo con ustedes.

A Sam, Jime, Omar y Arturo, amigos que obtuve en el laboratorio, biólogos maravillosos y comprometidos con el quehacer científico, y que siempre estuvieron dispuestos a enriquecer mi formación académica y personal con sus tan valiosas aportaciones. A Dani y Gaby, compañeras del laboratorio, siempre dispuestas a ayudarnos y orientarnos.

Finalmente, y no por eso de menor importancia, gracias a Dios por haberme escogido a mí para vivir rodeada de tantas personas tan maravillosas y de tantos éxitos, y por ayudarme a llegar hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Generalidades sobre Diabetes	4
3.1.1 Clasificación de la Diabetes mellitus	6
3.1.2 Complicaciones de la Diabetes	9
3.1.3 Epidemiología	11
3.2 Diabetes mellitus tipo 2	14
3.2.1 Patogénesis	14
3.2.2 Epidemiología	17
3.2.3 Manifestaciones clínicas	18
3.2.4 Criterios diagnósticos de la Diabetes mellitus tipo 2	19
3.3 Complicaciones de la Diabetes mellitus tipo 2	20
3.3.1 Complicaciones macrovasculares	20
3.3.2 Complicaciones microvasculares	21
3.4 Digestión y absorción de carbohidratos	23
3.5 Tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2	30
3.5.1 Inhibidores de α -glucosidasas	31
3.5.2 Acarbosa	32
3.5.3 Inhibidores de α -glucosidasas de origen natural	33
3.6 Modelos animales para el estudio de la diabetes mellitus tipo 2	35
3.6.1 Modelo hiperglucémico STZ-NA	37
3.7 Etnofarmacología	39
3.8 <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ortega) Sarg.	40
3.9 <i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl.	44
4. JUSTIFICACIÓN	47
5. OBJETIVOS	48
5.1 Objetivo General	48
5.2 Objetivos Particulares	48
6. HIPÓTESIS	49

7. MATERIALES Y MÉTODOS	50
7.1 Colecta del material vegetal	50
7.2 Elaboración de extractos vegetales y cálculo de dosis	50
7.2.1 Extracto acuoso de la parte aérea de <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ortega) Sarg.	50
7.2.2 Extracto etanol-agua de la parte aérea de <i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl.	51
7.2.3 Cálculo de dosis	51
7.3 Experimentación <i>in vivo</i>	52
7.3.1 Animales experimentales	52
7.3.2 Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA	52
7.3.3 Grupos experimentales	53
7.3.4 Pruebas de tolerancia oral a la sacarosa	53
7.4 Inhibición de α -glucosidasas <i>in vitro</i>	54
7.5 Análisis estadístico	55
8. RESULTADOS	56
8.1 Cálculo de dosis	56
8.2 Pruebas de tolerancia oral a la sacarosa	56
8.3 Ensayos de la medición de la actividad <i>in vitro</i> de las α -glucosidasas	60
9. DISCUSIÓN	63
10. CONCLUSIONES	66
11. BIBLIOGRAFÍA	67

1. RESUMEN

La diabetes mellitus es un conjunto de alteraciones metabólicas que afecta al 8.5% de la población adulta mundial y al 15.8% de la población mexicana. Mediante el control de la glucosa sanguínea a través de diferentes hipoglucemiantes orales es posible prevenir las complicaciones a largo plazo ocasionadas por la diabetes. Dentro de los fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes se encuentran los inhibidores de α -glucosidasas, los cuales retrasan la absorción de los carbohidratos, reduciendo el pico de hiperglucemia postprandial.

A pesar de contar con antecedentes del uso de *Eysenhardtia polystachya* y *Calea integrifolia* en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, aún no existen registros en la literatura científica que expliquen el mecanismo de acción de ambas especies. Por lo que en el presente estudio se probaron los efectos de los extractos etanol-agua (1:1) de la parte aérea de *Eysenhardtia polystachya* y acuoso de la parte aérea de *Calea integrifolia* sobre la actividad *in vivo* e *in vitro* de las enzimas α -glucosidasas de levadura y de intestino de rata.

Los resultados de las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa en ratas Wistar normoglucémicas e hiperglucémicas STZ-NA (estreptozotocina-nicotinamida) mostraron que el extracto de *C. integrifolia* no inhibió ni disminuyó de manera significativa el pico hiperglucémico postprandial. Por su parte, con el extracto de *E. polystachya* hubo una disminución significativa del pico hiperglucémico postprandial, pero no una inhibición. Los ensayos *in vitro* permitieron observar que éstas especies no tienen un efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas de rata. Con respecto al ensayo realizado con α -glucosidasas de levadura, se observó una tendencia hacia la disminución de la actividad *in vitro* con *E. polystachya*, mientras que con *C. integrifolia* no se obtuvo inhibición.

Los resultados obtenidos contribuyeron al entendimiento del mecanismo de acción de ambas plantas y permitieron determinar que ni *C. integrifolia* ni *E. polystachya* tienen un efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas. Debido a lo anterior, será necesario realizar otros protocolos experimentales que permitan dilucidar el mecanismo de acción a través del cual estas plantas ejercen su efecto hipoglucemiante.

2. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es considerada una de las mayores emergencias de salud a nivel mundial del siglo XXI. Una persona que padece diabetes presenta niveles elevados de glucosa sanguínea debido a una producción insuficiente de insulina y/o a una respuesta inapropiada del cuerpo a esta hormona (International Diabetes Federation, 2017).

Los niveles elevados de glucemia se encuentran asociados a daños en el sistema vascular a largo plazo (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003). Este tipo de complicaciones termina siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes diabéticos. Por lo tanto, si la diabetes no es diagnosticada y controlada, puede tener efectos devastadores e irreversibles en el organismo (International Diabetes Federation, 2017).

Al ser la diabetes un grupo diverso de trastornos metabólicos con diferentes causas, se sabe que numerosos procesos patogénicos están involucrados en su evolución. Sin embargo, se han identificado algunos elementos clave en la etiopatogénesis de la diabetes, determinando que hay participación tanto de factores genéticos, como de factores ambientales (World Health Organization, 1985). El cambio en el estilo de vida que ha ocurrido en la sociedad durante los últimos 50 años, es decir, la reducción de la actividad física y una mayor ingesta calórica, han ocasionado un aumento en la prevalencia de la diabetes, específicamente de la DM2 (Feinglos y Bethel, 2008). Lo anterior se refleja en las cifras publicadas por la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), pasando de 382 millones de diabéticos en 2013 a 425 millones en el año 2017 (International Diabetes Federation, 2017)

Conociendo las consecuencias a las que se dirige una población con un número elevado de personas diabéticas, resulta necesario llevar a cabo investigaciones que nos permitan ampliar el conocimiento sobre este padecimiento con el propósito de alcanzar su contención y prevención. Lo anterior permitirá lograr una reducción de las complicaciones que se desarrollan a largo plazo, así como su morbilidad y mortalidad.

El control de la concentración de glucosa sanguínea es el principal objetivo de los fármacos empleados en el tratamiento de esta enfermedad, denominados hipoglucemiantes orales. Si esto se logra, entonces resulta posible retrasar o erradicar la aparición de complicaciones posteriores (Andrade-Cetto *et al.*, 2008).

Los inhibidores de α -glucosidasas se encuentran entre los hipoglucemiantes orales que retrasan la absorción de carbohidratos en su forma simple, lo cual permite reducir los niveles de hiperglucemia postprandial. La acarbosa es el fármaco de este tipo de hipoglucemiantes más utilizado en el tratamiento de la DM2 y es un producto natural aislado de la fermentación de cultivos de *Actinoplanes* sp. (Schmidt *et al.*, 1977).

Así como la acarbosa, otros fármacos hipoglucemiantes han sido aislados de fuentes naturales, algunas de las cuales son utilizadas por la medicina tradicional. La riqueza vegetal de nuestro país y el amplio uso de extractos herbales para el tratamiento de esta enfermedad, nos provee de un extenso material, cuyos usos y efectos deben ser investigados, entendidos y confirmados para lograr la obtención de nuevos fármacos (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

El uso de palo azul (*Eysenhardtia polystachya*) y jehuite amargoso (*Calea integrifolia*) en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes, así como los estudios realizados con anterioridad (Pérez-Gutiérrez y García-Baez, 2014; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2016), las proponen como potenciales agentes hipoglucemiantes de los cuales resulta necesario determinar, entre otros aspectos, su mecanismo de acción.

3. ANTECEDENTES

3.1 GENERALIDADES SOBRE DIABETES MELLITUS.

La diabetes mellitus se define como un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por una condición de hiperglucemia crónica, ocasionada por la producción insuficiente de insulina debido al fallo de las células β pancreáticas, por defectos en la acción de esta hormona sobre los tejidos blanco o ambas (International Diabetes Federation, 2017)

La insulina es sintetizada y secretada por las células β pancreáticas, estas células son consideradas sensores energéticos, ya que se encuentran monitoreando de manera constante la concentración de glucosa sanguínea. La secreción de insulina desde las células β es estimulada por diversos compuestos, denominados secretagógos, algunos de los cuáles son: nutrientes metabolizados, neurotransmisores, hormonas o fármacos; siendo el mecanismo estimulado por la glucosa, el principal y el mejor caracterizado (Fig. 1) (Hiriart *et al.*, 2013).

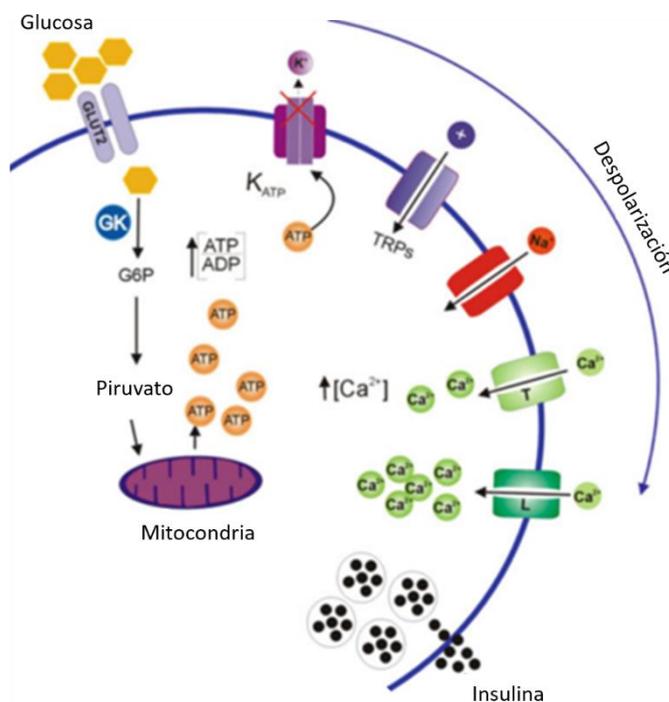


Figura 1. **Secreción de Insulina estimulada por Glucosa desde la célula β pancreática.** La glucosa ingresa a la célula β por el GLUT2 para ser convertida a piruvato y obtener ATP, cuya elevada concentración cierra los canales K_{ATP} y abre canales TRPs, de Na^+ y de Ca^{2+} tipo T y L, despolalizando la membrana; la elevada concentración de Ca^{2+} permite el movimiento y la secreción de la insulina desde las vesículas (Modificado de Hiriart *et al.*, 2013).

En condiciones no patológicas, después de que la insulina es secretada, viaja por torrente sanguíneo y se une a su receptor en los tejidos diana (receptor de insulina), desencadenando múltiples vías de señalización, principalmente en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado (Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes, 2002; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

Las acciones de esta hormona son diversas; sin embargo, sus principales funciones en los tejidos mencionados, son aumentar la captación, el transporte y la oxidación (glucólisis) de glucosa. Además, en el tejido adiposo inhibe la hidrólisis de ácidos grasos (lipólisis), y en el hígado la síntesis de glucosa (gluconeogénesis) (Fig. 2) (Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes, 2002; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

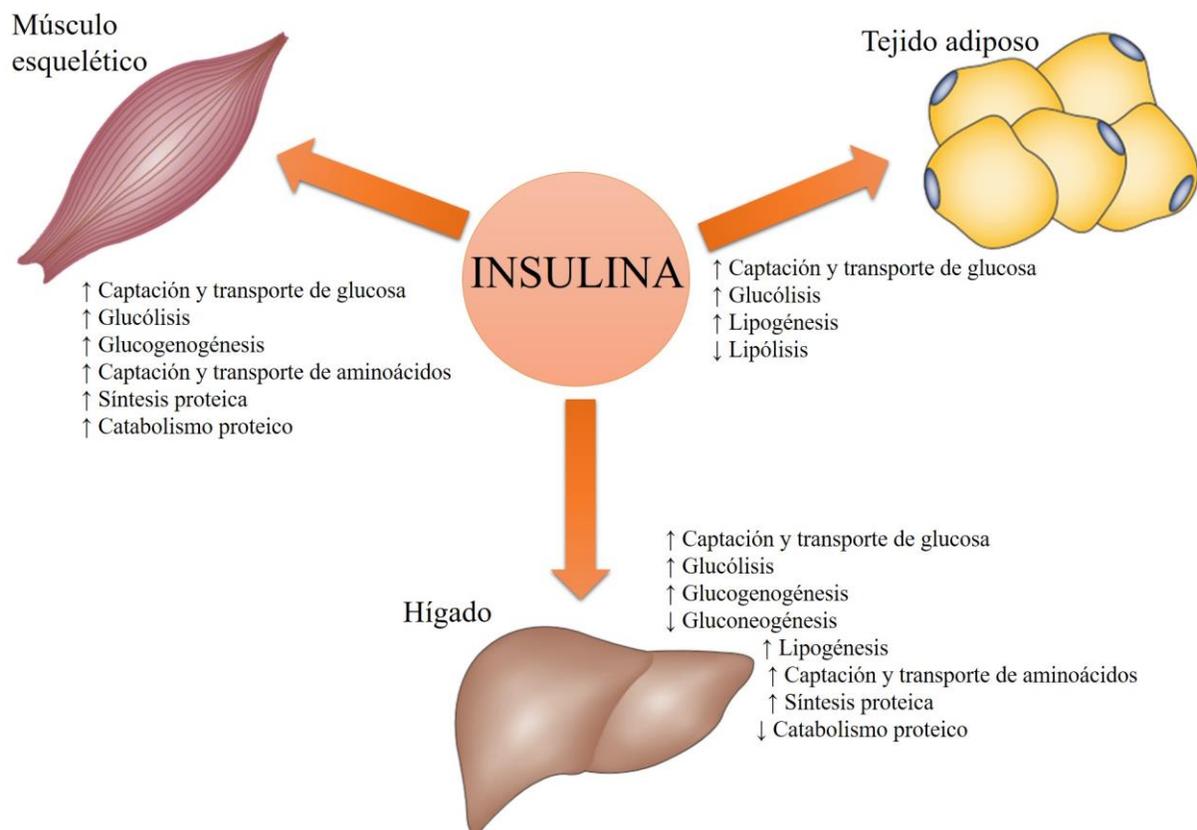


Figura 2. **Acción de la Insulina sobre los principales tejidos blanco (músculo esquelético, tejido adiposo e hígado).** La insulina participa en múltiples procesos metabólicos que permiten regular los niveles de glucosa sanguínea (Adaptado de Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes, 2002).

La deficiencia en la producción y liberación de insulina desde las células β pancreáticas se debe al fallo de las mismas, el cual comienza desde muchos años antes del diagnóstico de la enfermedad. La disfunción de éstas células implica tanto la pérdida de su masa, como de su función, y ocurre por la activación de vías apoptóticas, provocando una reducción en el número de células y por lo tanto en la secreción de insulina (Keane y Newsholme, 2014).

La resistencia a la insulina, es una condición patológica en la que existe una disminución en la capacidad de esta hormona para ejercer sus acciones biológicas, como consecuencia de una deficiencia en su señalización (Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes, 2002; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008)

Las funciones adecuadas de la insulina, y por ende, el mantenimiento de las condiciones normales de glucemia, dependen del balance existente entre la secreción y la acción de la insulina (Stumvoll *et al.*, 2005). Debido a lo anterior, es que en un individuo diabético existe una alteración en el metabolismo de nutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas, dirigiendo de esta forma a una condición de hiperglucemia crónica (Poretsky, 2010).

3.1.1 Clasificación de la Diabetes mellitus

Antes de 1979, la clasificación de diabetes se encontraba basada en ciertos hallazgos clínicos en los pacientes, teniendo al menos seis categorías diferentes. Entre los criterios diagnósticos que delimitaban a las categorías se pueden mencionar algunos ejemplos, como la edad en que comenzaba la enfermedad, recibiendo el nombre de diabetes juvenil o diabetes de adultos; o el tipo de tratamiento que recibían los pacientes, denominándose diabetes insulino-dependiente o no insulino-dependiente (Davidson, 2011; Poretsky, 2010).

Después de esta fecha, el Grupo Nacional de Datos de Diabetes (NDDG, por sus siglas en inglés) en conjunto con la Organización Mundial de la Salud, establecieron un conjunto de criterios que permitieran realizar un diagnóstico de la diabetes, así como una clasificación unificada de la misma. Fue así como ambos órganos publicaron un reporte en el que propusieron una división de la DM basada en el conocimiento acumulado que se tenía sobre esta enfermedad, es decir, se basaron en una combinación de manifestaciones clínicas, patogénesis y tratamiento (Poretsky, 2010).

La clasificación actual comprende cuatro grupos, los cuales se muestran en la Tabla 1. Esta nueva clasificación incluye los términos diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, los cuales remplazan la terminología empleada anteriormente que se basaba en el tipo de tratamiento que recibían los pacientes. De esta manera, la diabetes mellitus insulino-dependiente (IDDM, por sus siglas en inglés) pasó a ser la diabetes tipo 1 (DM1), mientras que la diabetes mellitus no insulino-dependiente (NIDDM, por sus siglas en inglés) es actualmente denominada diabetes tipo 2 (DM2) (Poretsky, 2010).

Tabla 1. **Clasificación de la Diabetes mellitus** (Tomado de American Diabetes Association, 2017)

I. Diabetes tipo 1
A. Autoinmune
B. Idiopática
II. Diabetes tipo 2
III. Otros tipos
A. Defectos genéticos de la función de la célula β
B. Defectos genéticos en la acción de la insulina
C. Enfermedad del páncreas exocrino
D. Endocrinopatías
E. Inducido por drogas o químicos
F. Infecciones
G. Otros mediadores inmunes
H. Otros síndromes genéticos específicos
IV. Diabetes gestacional

La DM1 se caracteriza por presentar una deficiencia absoluta en la secreción de insulina debido a la destrucción de las células β por una respuesta del sistema inmune frente a estas células, por lo que es denominada como un trastorno autoinmune (American Diabetes Association, 2017). Se han identificado ciertos marcadores asociados a la destrucción de estas células, los cuales se encuentran presentes en un 85-90% de los pacientes recién diagnosticados con DM1 (American Diabetes Association, 2010; Poretsky, 2010).

La etiología de algunas otras formas de DM1 es poco conocida, por lo que son denominadas idiopáticas. Aunque poco se sabe de estas formas de diabetes, se ha establecido que son enfermedades heredadas y que no hay evidencia de autoinmunidad contra las células β (American Diabetes Association, 2010; Poretsky, 2010).

El segundo grupo, la DM2 resulta de una combinación de resistencia a la insulina y de una alteración en la secreción de la misma, lo que impide mantener la homeostasis de la glucosa (Hiriart *et al.*, 2013). Por ser este tipo de diabetes al que se dirige el presente trabajo, esta será descrita detalladamente más adelante.

El tercer grupo de la clasificación incluye los tipos de diabetes menos comunes que se originan bajo condiciones específicas o por la presencia de algún síndrome (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003).

Finalmente, el cuarto grupo de la clasificación incluye al tipo de diabetes que es diagnosticada durante el segundo o tercer trimestre del embarazo, por lo que recibe el nombre de diabetes gestacional (American Diabetes Association, 2017; Poretsky, 2010). La diabetes gestacional ocurre por una disminución de la tolerancia a la glucosa, generada por cambios metabólicos de origen hormonal (Guzmán-Juárez y Madrigal-Bujaidar, 2003).

3.1.2 Complicaciones de la Diabetes

Las complicaciones de la diabetes pueden clasificarse en dos grupos, las complicaciones agudas y las complicaciones crónicas (Fig. 3) (Mediavilla-Bravo, 2001).

Las complicaciones agudas son de naturaleza metabólica y potencialmente reversibles. Este tipo de complicaciones ocurren bajo diversas circunstancias, pero la principal de ellas es el abandono del tratamiento farmacológico. Dentro de esta clasificación se incluyen la cetoacidosis diabética y el síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico, las cuales pueden presentarse en ambos tipos de diabetes; sin embargo, la primera de ellas es más recurrente en la DM1, mientras que la segunda se presenta con mayor frecuencia en la DM2 (Mediavilla-Bravo, 2001).

Por su parte, las complicaciones crónicas de la diabetes tienden a surgir después de varios años a partir del diagnóstico de la enfermedad, se originan por niveles constantemente elevados de glucosa sanguínea y se presentan generalmente en pacientes con DM2, por lo que serán explicadas a detalle más adelante (Mediavilla-Bravo, 2001).

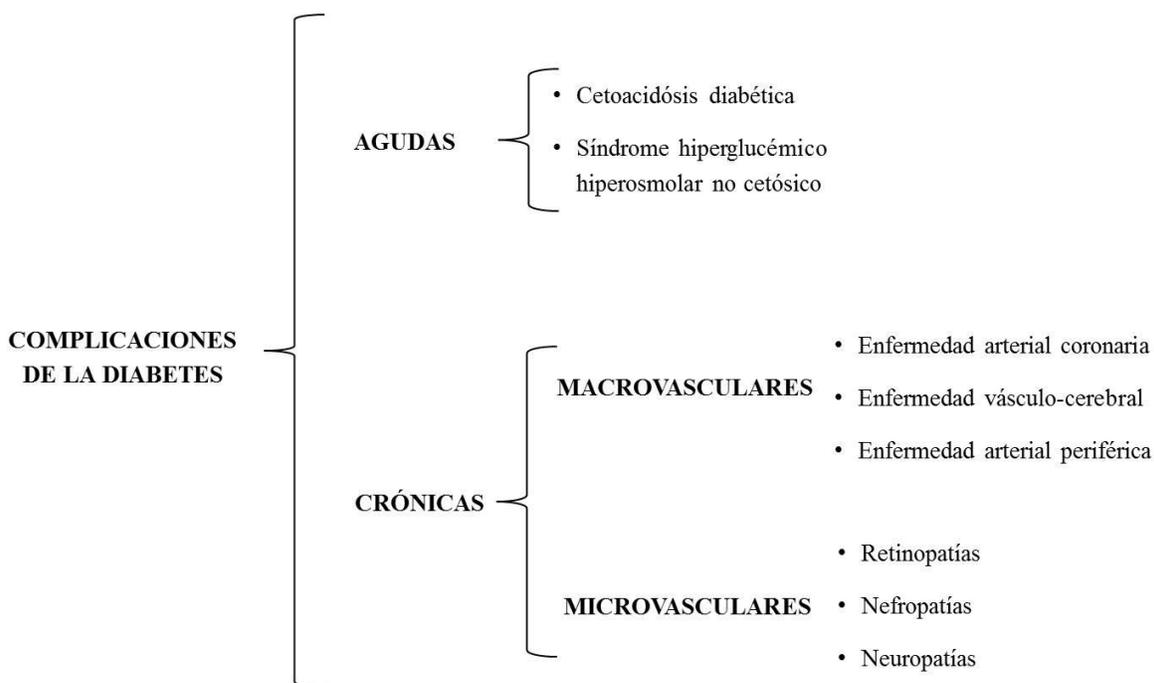


Figura 3. **Clasificación de las complicaciones de la diabetes.** Existen complicaciones agudas y complicaciones crónicas, las cuales son características de la DM1 y de la DM2, respectivamente (Adaptado de Mediavilla-Bravo, 2001).

La *cetoacidosis diabética* afecta anualmente a un 2-5% de las personas que padecen DM1. Se define como el estado en el que hay una presencia excesiva de cuerpos cetónicos en la sangre, a consecuencia de la utilización de las grasas como fuente de energía, puesto que la baja o nula secreción de insulina impide la utilización de la glucosa (Mediavilla-Bravo, 2001).

Cuando existe insulinopenia o deficiencia de insulina y además ocurre un aumento en la producción de hormonas antagonistas de la insulina (glucagón, catecolaminas, cortisol y hormona del crecimiento), se activan los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis, lo que produce un aumento en la producción de la enzima lipasa (Mediavilla-Bravo, 2001). Esta enzima produce un incremento en la concentración de triglicéridos y de ácidos grasos libres, los cuáles son dirigidos al hígado a través del torrente sanguíneo, donde sufren un proceso llamado β -oxidación, a partir del cual se obtiene acetil CoA. Este producto, común a la degradación de polisacáridos, lípidos y proteínas, puede producir cuerpos cetónicos (acetoacetato, ácido β -hidroxibutírico y acetona) a través del proceso de cetogénesis, los cuales son parcialmente excretados en la orina y cuya sobreproducción lleva a un estado de acidosis (Mediavilla-Bravo, 2001; Tavera-Hernández y Coyote-Estrada, 2006).

Por su parte, el *síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetósico* ocurre cuando existe una hiperglucemia sostenida, ocasionada por insulinopenia, alta producción de hormonas antagónicas de la insulina y baja captación periférica de glucosa. Con la hiperglucemia se produce glucosuria, y esto da como resultado una diuresis osmótica (aumento de la micción) y, por lo tanto, un desequilibrio de agua y electrolitos. Cuando la diuresis osmótica es prolongada puede llevar al paciente diabético a una estado de hipovolemia (disminución del volumen total de la sangre) y a una grave deshidratación, ocasionando una pérdida de 8 a 12 litros de agua corporal (Mediavilla-Bravo, 2001).

3.1.3 Epidemiología

La prevalencia global de la DM está aumentando rápidamente como resultado del envejecimiento de la población, la urbanización y los cambios asociados al estilo de vida (Lei Chen *et al.*, 2012).

El mayor aumento de individuos diagnosticados con diabetes se registró en países de bajos y medianos ingresos, donde una importante proporción de pacientes diabéticos se encontraban entre los 40 y los 59 años de edad, es decir, esta enfermedad tiende a presentarse en una población cada vez más joven (Poretsky, 2010).

La DM2 corresponde al mayor porcentaje de individuos diagnosticados, comprendiendo del 90 al 95% de los casos totales de diabetes, mientras que la DM1 representa entre un 5 y 10% de los casos de diabetes a nivel global y su incidencia entre la población se debe a ciertos factores como la edad, la historia familiar, el ambiente, la genética y la raza (Poretsky, 2010).

En la edición del año 2017 del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés), se estimó que casi 425 millones de personas, es decir, el 8.8% de la población mundial, vivía con dicha enfermedad; de este modo, casi fue alcanzado el número de pacientes diabéticos que la misma IDF estimó en 2009 se alcanzaría hasta el año 2030, que era de 438 millones de personas. El hecho anterior demuestra que la diabetes presenta una rápida y evidente tendencia hacia el incremento (International Diabetes Federation, 2017)

Las últimas estimaciones realizadas por la IDF en 2017, indican que para el año 2045 el número de personas diabéticas de 20 a 79 años de edad se incrementará a 629 millones, siendo la región de Norte América y del Caribe la que presenta la mayor prevalencia per cápita, con uno de cada ocho adultos con esta enfermedad (Fig. 4) (International Diabetes Federation, 2017)

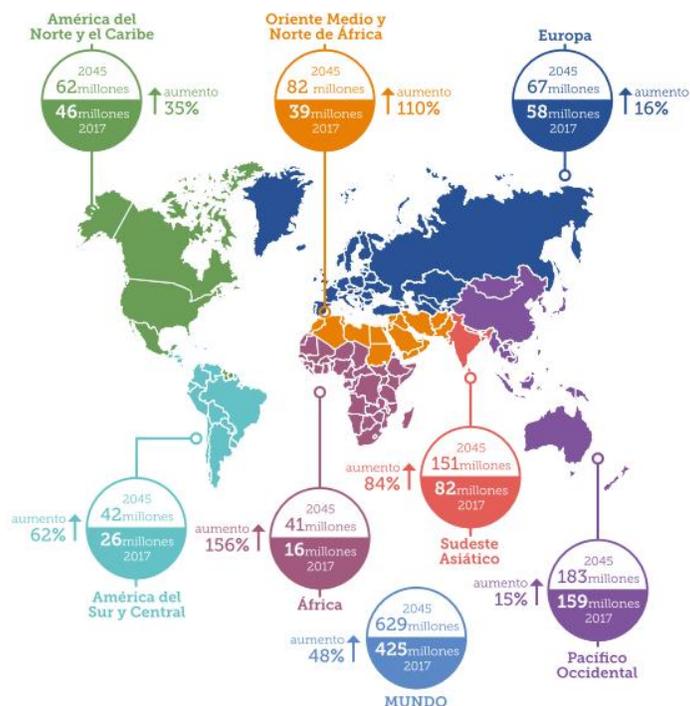


Figura 4. **Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2017 y 2045.** (Tomado de International Diabetes Federation, 2017).

Respecto al comportamiento de esta enfermedad en México, durante las últimas tres décadas, el número de mexicanos diabéticos diagnosticados ha aumentado. Lo anterior se observa en la figura 5, donde se muestra que del año 1980 al año 2016, el porcentaje de adultos diabéticos casi se duplicó (World Health Organization, 2016).

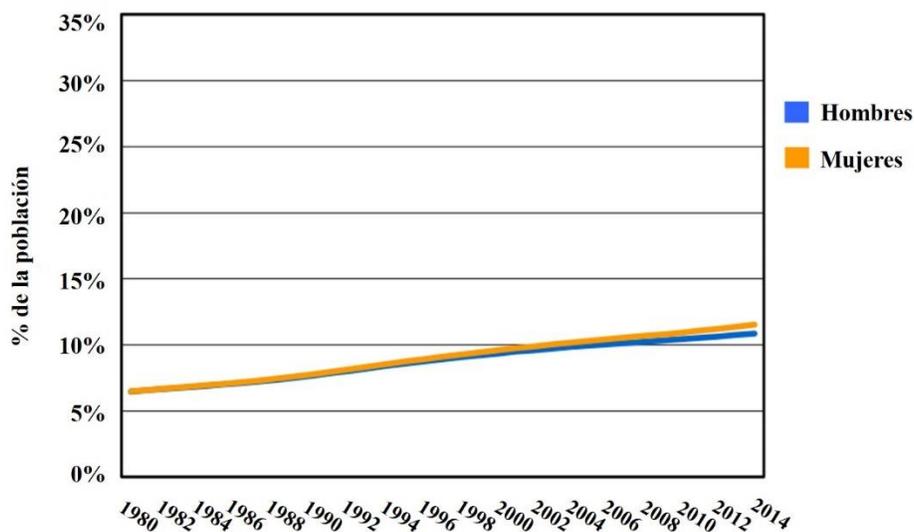


Figura 5. **Tendencia de la diabetes en hombres y mujeres mexicanos desde 1980 hasta el año 2014** (Tomado de World Health Organization, 2016)

Según las cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) en el perfil proporcionado de los países para la diabetes en 2016, un 10.4% de la población mexicana total padecía diabetes, es decir, casi 12 millones de adultos, siendo las mujeres el género con mayor porcentaje de pacientes con un 11%, mientras que el 9.7% de los hombres padece esta enfermedad. No obstante, la IDF publicó que un 15.8% de la población mexicana adulta padecía esta enfermedad y que casi un 34% de los mexicanos adultos con diabetes aún no han sido diagnosticados, lo que aumentaría el número de pacientes (International Diabetes Federation, 2017; World Health Organization, 2016).

El aumento en la incidencia de la diabetes ha ocasionado que ésta enfermedad se profile como la segunda causa de muerte entre la población mexicana, con un porcentaje de mortalidad del 14%, sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares (Fig. 6) (World Health Organization, 2016).

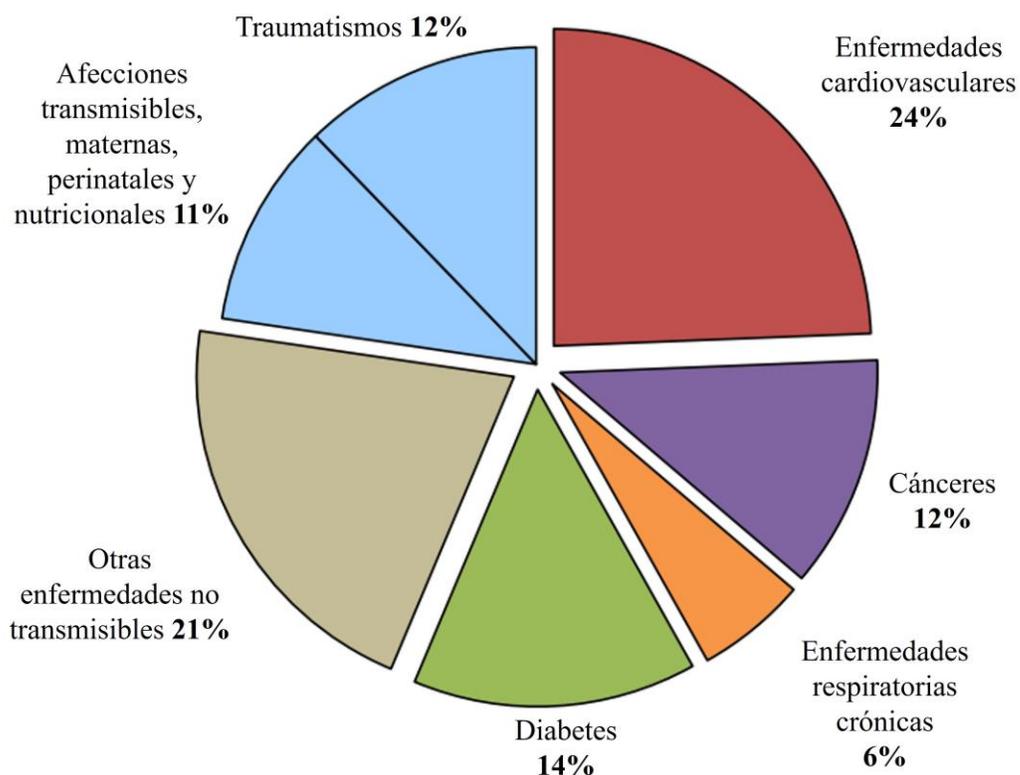


Figura 6. **Mortalidad proporcional: porcentaje total de muertes de todas las edades en México** (Tomado de World Health Organization, 2016)

3.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2

La DM2 es una enfermedad metabólica caracterizada por presentar anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Es considerada un problema de salud global que aumenta año con año, y es el tipo de diabetes más común entre la población que padece esta enfermedad (De Fronzo *et al.*, 2015). La DM2 es causada por la interacción de una variedad de factores genéticos, epigenéticos y ambientales (Prasad y Groop, 2015).

3.2.1 Patogénesis

A pesar de que la DM2 se presenta en el 90-95% de los pacientes diabéticos diagnosticados, la patogénesis de esta enfermedad aún permanece poco clara, principalmente porque este tipo de diabetes es un síndrome heterogéneo con causas multifactoriales (Ampudia-Blasco, 2003).

El riesgo de que un individuo desarrolle DM2 depende de la interacción que ocurre entre los factores genéticos y ambientales a los que éste se ve expuesto, los cuales afectan la funcionalidad de las células β pancreáticas y la sensibilidad periférica a la insulina (Ampudia-Blasco, 2003).

Algunos de los factores de riesgo a los que obedece este tipo de diabetes son la raza, la edad, la historia familiar y en una proporción mucho mayor, los hábitos que dominan el estilo de vida de las personas, así como las condiciones comorbidas, entre las cuales, la más importante es la obesidad, la cual se encuentra íntimamente relacionada al incremento en la prevalencia de DM2 (Tabla 2) (Poretsky, 2010).

Para que tenga lugar la aparición de esta enfermedad, es necesario que ocurra la alteración de la función de la célula β pancreática, además de la resistencia periférica a la insulina, y ya que una puede originar a la otra, aún no se ha determinado cuál de las dos ocurre en primer lugar (Ampudia-Blasco, 2003).

Tabla 2. **Factores de riesgo para DM2** (Modificado de Poretzky, 2010)

Edad \geq 45 años
Obesidad (IMC según el grupo étnico)
Historia Familiar de Diabetes
Inactividad física habitual
Raza o Etnicidad
Hipertensión (\geq 140/90 mmHg en adultos)
Colesterol HDL (\geq 135 mg/dl)
Triglicéridos \geq 250 mg/dl
Alteraciones en la tolerancia a la glucosa
Alteraciones en los niveles de glucosa en ayunas
Historia de Enfermedad Cardiovascular
Síndrome de Ovario Poliquístico
Diabetes gestacional

Con base en el conocimiento que se tiene sobre esta enfermedad, se ha establecido que si un individuo es susceptible a desarrollar DM2, atravesará entonces por las dos etapas siguientes: i) adaptación y ii) fallo (Alejandro *et al.*, 2015).

En la etapa de adaptación, el individuo aún es capaz de mantener la glucemia en niveles normales, a expensas de un aumento en la secreción de insulina desde las células β pancreáticas, lo que lo lleva a un estado de hiperinsulinemia (Ampudia-Blasco, 2003). Posteriormente, ocurre el fallo de la célula β pancreática, a través de procesos como el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad, procesos que eventualmente llevan a la apoptosis de la célula (Alejandro *et al.*, 2015).

Finalmente, el individuo continúa con una baja secreción de insulina y resistencia a la misma, por lo que esta hormona no realiza sus funciones normales, ocasionando el aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, la disminución en el consumo de glucosa en el músculo esquelético y una mayor liberación de glucosa hepática (Fig. 7) (Stumvoll *et al.*, 2005).

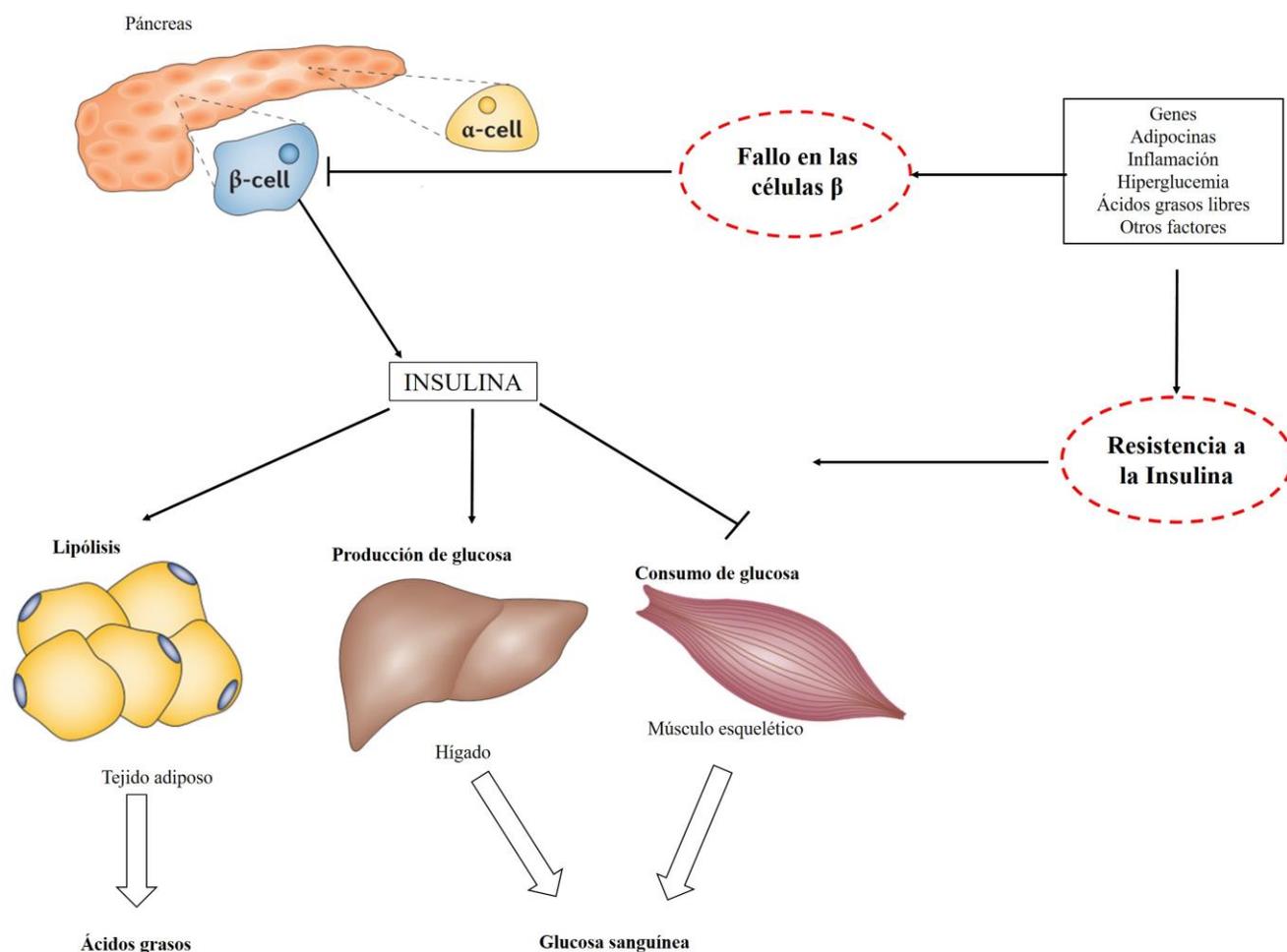


Figura 7. **Patofisiología de la Diabetes mellitus tipo 2.** Diversos factores genéticos y ambientales contribuyen al fallo de las células β pancreáticas, lo que provoca una disminución en la secreción de insulina. Aunado a esto, los tejidos diana (músculo esquelético, hígado y tejido adiposo) presentan resistencia a la insulina, lo que impide que las vías de señalización de esta hormona se lleven a cabo correctamente. Específicamente, no hay captación de glucosa en el músculo esquelético, hay un aumento en la producción de glucosa hepática (gluconeogénesis) y hay un aumento en la lipólisis en el tejido adiposo. Las dos primeras alteraciones contribuyen al aumento de la glucosa sanguínea, mientras que el aumento de la lipólisis provoca un crecimiento de la concentración de los ácidos grasos (Tomado de Stumvoll *et al.*, 2005).

3.2.2 Epidemiología

La DM2 es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y una de las enfermedades con mayor impacto sociosanitario debido a su alta prevalencia, a las complicaciones crónicas que produce y a su elevada tasa de mortalidad (Goday, 2002), como ya se mencionó, corresponde al 90-95% de los casos totales de diabetes. Los cambios culturales y sociales de la población como el envejecimiento, la urbanización, la poca actividad física y el elevado consumo calórico de los individuos, han propiciado el aumento de este tipo de diabetes (International Diabetes Federation, 2017).

La DM2 puede afectar a cualquier individuo, a pesar de ello, en ciertas regiones del mundo aparece en proporciones epidémicas. Por ejemplo, los indios Pima del estado de Arizona y la población Nauru en Oceanía, son los grupos con mayor prevalencia de DM2, siendo el 35 y 20% de los habitantes quienes presentan esta enfermedad, respectivamente (Goday, 2002; Poretsky, 2010). Mientras que en otras partes del mundo, la prevalencia registrada oscila entre el 2 y el 15% (Poretsky, 2010).

Además del incremento observado entre los adultos mayores y de edad media, la DM2 ha aumentado entre adultos jóvenes y niños en países como Estados Unidos, donde el 45% de las personas diagnosticadas con diabetes son niños, y en Japón, donde la prevalencia de este tipo de diabetes en edades comprendidas entre 10-19 y 20-29 años fue aproximadamente del 50% y 75%, respectivamente. La aparición de la DM2 desde una edad temprana fue reportada también en China, México, India y Australia (Wenyi Kang *et al.*, 2012).

En México, los estilos de vida poco saludables cada vez más comunes en la población han propiciado un aumento en la obesidad y el sobrepeso, los cuales están relacionados con la DM2, por lo que la prevalencia de esta enfermedad también ha incrementado en las últimas décadas, pasando de un porcentaje de prevalencia del 4% en 1993 al 9.17% en 2012, es decir, 6.4 millones de mexicanos diabéticos adultos diagnosticados. Mientras tanto, el porcentaje de adolescentes mexicanos con diagnóstico previo de diabetes es del 0.68%, lo que representa alrededor de 155 000 adolescentes diabéticos (Jiménez-Corona *et al.*, 2013).

Los datos anteriores demuestran que en los últimos 20 años, el número de mexicanos diabéticos previamente diagnosticados ha incrementado, y como consecuencia, también se ha observado un aumento en la prevalencia de las complicaciones de esta enfermedad. De tal manera que desde el año 2004, la diabetes es la segunda causa de muerte en el país con 64, 243 defunciones al año, según la ENSANUT (Jiménez-Corona *et al.*, 2013).

3.2.3 Manifestaciones clínicas

Frecuentemente, el paciente que padece diabetes es un individuo con sobrepeso u obesidad, y normalmente no presenta otro tipo de síntomas asociados a la enfermedad. Sin embargo, cuando existe una condición de hiperglucemia crónica, el individuo diabético presenta cuatro manifestaciones clínicas que ocurren debido a esta condición. Éstas alteraciones son poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso, las cuales serán explicadas a continuación (Ortega-Hernández *et al.*, 2005).

Cuando la concentración de glucosa sanguínea sobrepasa los niveles renales de eliminación, el organismo se ve condicionado a eliminar el exceso de ésta glucosa a través de un volumen de orina mayor al esperado, así como una frecuencia de micción mayor a la usual, ésta manifestación es denominada como *poliuria*. La pérdida excesiva de orina en el organismo conduce a que el individuo aumente la ingesta de líquidos, lo que se conoce como *polidipsia* (Ortega-Hernández *et al.*, 2005)

Como ya se mencionó anteriormente, la hiperglucemia es causada por una combinación de la deficiencia en la secreción y acción de la insulina, es decir, los tejidos blanco no son capaces de captar la glucosa proveniente de los alimentos, lo que obliga al organismo a consumir las proteínas y los lípidos de reserva, ocasionando una *pérdida de peso* y por consiguiente un aumento del apetito o *polifagia* (Ortega-Hernández *et al.*, 2005).

3.2.4 Criterios diagnósticos de la diabetes tipo 2

Existen cuatro pruebas principales establecidas por la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés), mediante las cuales se lleva a cabo el diagnóstico de un individuo como paciente diabético. La ADA recomienda que estas pruebas se realicen por duplicado para poder dar un diagnóstico certero (American Diabetes Association, 2010).

La prueba de HbA1C (hemoglobina glicada) mide el promedio en porcentaje de glucosa en sangre durante los últimos 2 o 3 meses; la prueba de glucosa plasmática en ayunas mide el nivel de glucosa en la sangre cuando el organismo se encuentra en ayuno (American Diabetes Association, 2010). Otra de las pruebas diagnósticas es a prueba de tolerancia oral a la glucosa, la cual mide los niveles de glucosa sanguínea antes de tomar una carga de glucosa y dos horas después de haber tomado la carga. Y finalmente, la prueba aleatoria o causal de glucosa plasmática permite medir los niveles de glucosa a cualquier hora del día (American Diabetes Association, 2010)

En la tabla 3 se indican los valores mínimos que deben obtenerse en cada prueba para poder dar un diagnóstico de diabetes.

Tabla 3. Criterios diagnósticos de la Diabetes mellitus tipo 2
(Tomado de American Diabetes Association, 2017)

HbA1C \geq 6.5 %

Glucosa plasmática en ayunas \geq 126 mg/dl

Prueba de tolerancia oral a la glucosa \geq 200 mg/dl (2 horas después)

Prueba aleatoria de glucosa plasmática \geq 200 mg/dl

3.3 COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

La hiperglucemia crónica, característica común de todos los tipos de diabetes principalmente de la DM2, se asocia con las complicaciones crónicas, es decir, con el fallo, la disfunción y el daño a largo plazo de diferentes órganos, especialmente de ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Prasad y Groop, 2015).

De igual forma, los niveles elevados de glucemia postprandial promueven procesos que causan disfunción endotelial, como el estrés oxidativo, la modificación de lipoproteínas, la glicación y el aumento en la concentración de productos finales de glicación avanzada (Giacco *et al.*, 2016).

El deterioro del sistema vascular que provocan las complicaciones crónicas, termina siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes que las presentan (Sánchez-Rodríguez, 2010). Es decir, las repercusiones de las complicaciones macrovasculares constituyen la principal causa de muerte en los pacientes diabéticos; mientras que las repercusiones de las complicaciones microvasculares afectan notablemente la calidad de vida de los pacientes y representan un elevado costo para el sistema sanitario (Mediavilla-Bravo, 2001).

Este tipo de complicaciones, se dividen a su vez en complicaciones microvasculares y complicaciones macrovasculares, según el tipo de vaso sanguíneo que se vea afectado.

3.3.1 Complicaciones macrovasculares

Las complicaciones crónicas macrovasculares (aterosclerosis) se refieren a la afectación arteriosclerótica de los vasos sanguíneos de mediano y gran calibre. Estas complicaciones representan la principal causa de mortalidad y morbilidad entre los pacientes diabéticos, pues cerca del 75-80% de estos pacientes muere de causa vascular (Mediavilla-Bravo, 2001; Sánchez-Rodríguez, 2010).

Las complicaciones macrovasculares son *enfermedades de las arterias coronarias*, la cuales ocurren cuando las arterias que suministran sangre al organismo se endurecen y se vuelven más estrechas; *enfermedades de las arterias periféricas*, que ocurren cuando existe un estrechamiento de los vasos sanguíneos fuera del corazón; y *enfermedades vasculares cerebrales* que ocurren por la obstrucción de una arteria, lo que produce una interrupción o pérdida repentina del flujo sanguíneo cerebral (Mediavilla-Bravo, 2001).

3.3.2 Complicaciones microvasculares

Las complicaciones crónicas microvasculares ocurren por la afectación de los capilares y se relacionan íntimamente con la duración y magnitud de la hiperglucemia (Mediavilla-Bravo, 2001).

La DM provoca oftalmopatías diabéticas ya que puede afectar a cualquier estructura del aparato visual, como el cristalino produciendo cataratas, la cámara anterior provocando glaucoma del ángulo abierto, la córnea, el iris, el nervio óptico, los nervios oculomotores y, por supuesto, la retina. La retina es la estructura ocular más afectada por la enfermedad, ocasionando una *retinopatía diabética*, la cual es la complicación más frecuente que presentan los diabéticos, en especial los pacientes con DM2 (Mediavilla-Bravo, 2001).

El engrosamiento de los glomérulos de las nefronas de los riñones, llamada *nefropatía diabética* es la causa principal de insuficiencia renal y una de las complicaciones más importantes de la diabetes a largo plazo. Las nefropatías se manifiestan con un aumento de la excreción urinaria de albúmina y alteraciones en la filtración glomerular y se caracteriza por albuminuria superior a 300 mg/24 h, hipertensión e insuficiencia renal progresiva (Mediavilla-Bravo, 2001; Sánchez-Rodríguez, 2010).

Las alteraciones en las fibras nerviosas del sistema nervioso periférico (nervios externos al cerebro y la médula espinal), llamadas *neuropatías diabéticas*, pueden expresarse en cualquier localización corporal, afectando uno o varios nervios (Bril *et al.*, 2013).

Mediante el Estudio del Control y las Complicaciones Diabéticas (DCCT, por sus siglas en inglés) y el Estudio de Epidemiología de Complicaciones e Intervenciones en Diabetes (EDIC, por sus siglas en inglés), fue posible establecer la relación existente entre la hiperglucemia crónica y las complicaciones crónicas (Gugliucci, 2000).

A través de estos estudios se determinó que la disminución de los niveles de HbA1c redujo la progresión y/o la aparición de todas las complicaciones microvasculares, con una reducción del 76% de las retinopatías, del 50% de las nefropatías y del 60% de las neuropatías; así como de las complicaciones macrovasculares, como una reducción del 42% de las enfermedades cardiovasculares y del 57% de los ataques al corazón y muerte (National Diabetes Information Clearinghouse, 2008). Lo anterior quiere decir que un control estricto de la glucemia reduce considerablemente el riesgo de complicaciones crónicas (Gugliucci, 2000).

3.4 DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos son un componente importante de la dieta, debido a que proveen de energía al organismo (Maughan, 2013). Sin embargo, se ha determinado que una elevada ingesta de carbohidratos refinados se asocia a un aumento en la glucosa plasmática y en los niveles de insulina durante el periodo postprandial, así como de los niveles de triglicéridos y de colesterol lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) (Giacco *et al.*, 2016).

Lo anterior resulta importante para los pacientes diabéticos, ya que se ha demostrado que las concentraciones de glucosa sanguínea son un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como se mencionó en la sección anterior (Giacco *et al.*, 2016).

Los carbohidratos se clasifican en cuatro tipos principales: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los *monosacáridos*, o azúcares simples, son las unidades básicas estructurales de los carbohidratos, y se destacan la glucosa, la fructosa y la galactosa (Fig. 8) (Maughan, 2013).

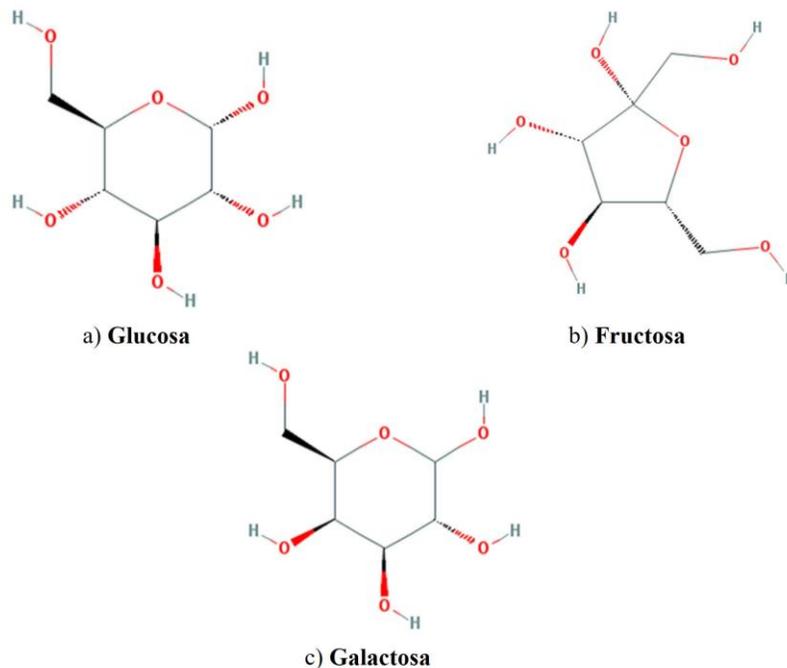


Figura 8. **Principales monosacáridos** (Tomado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017)

La unión de dos moléculas de monosacáridos, a través de una reacción de condensación, da como resultado la formación de un *disacárido* y la liberación de una molécula de H₂O. Esta reacción de condensación establece un enlace glucosídico entre los dos monosacáridos que se unen. Los principales disacáridos de la dieta son maltosa, lactosa y sacarosa: la unión de dos moléculas de glucosa, las cuales se unen en el carbono 1 y 4, resulta en una *maltosa*; la unión de una galactosa y una glucosa por los carbonos 1 y 4 respectivamente, resulta en una *lactosa*; y la unión de una glucosa y una fructosa en los carbonos 1 y 2, da como resultado una *sacarosa* (Fig. 9) (Maughan, 2013).

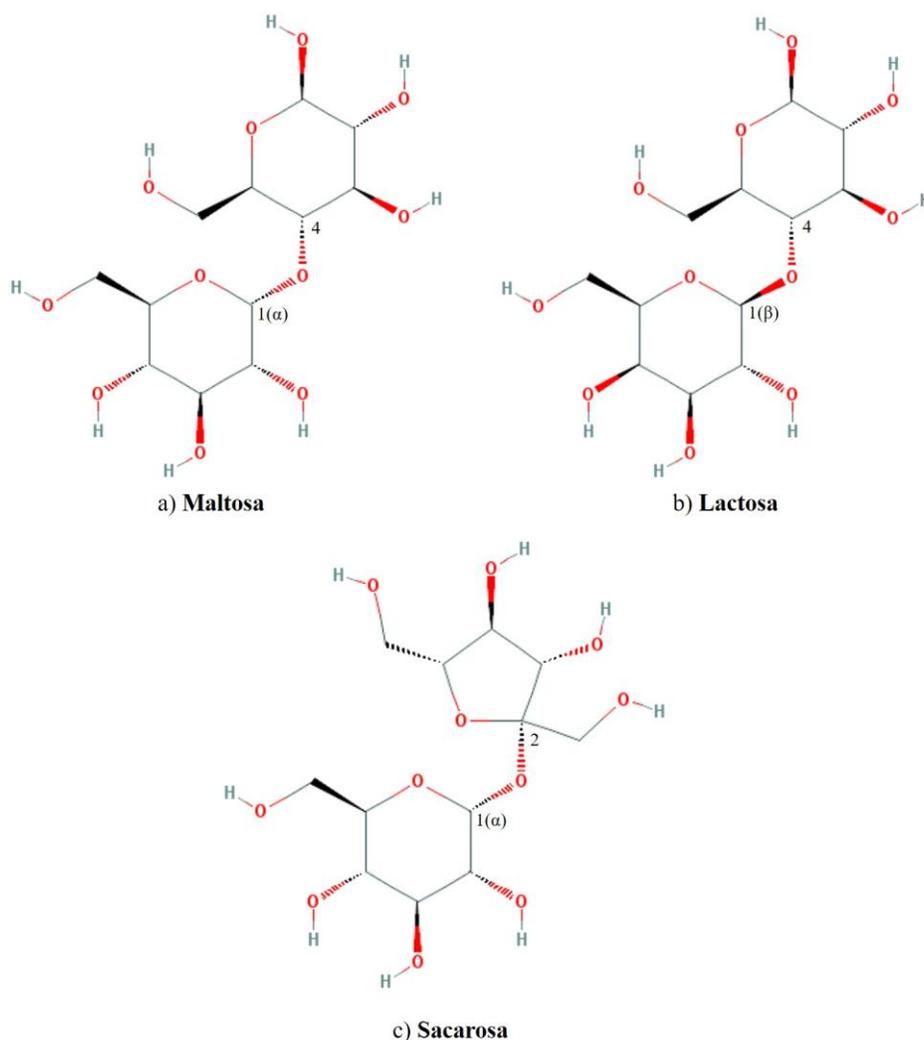


Figura 9. **Principales disacáridos** (Tomado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017)

La unión de hasta 20 monosacáridos resulta en la formación de un *oligosacárido*, y a partir de 20 monosacáridos se denominan *polisacáridos*, los cuales pueden estar conformados por las mismas unidades de monosacáridos o por dos o más tipos, denominándose homopolisacáridos y heteropolisacáridos, respectivamente (Hasudungan, 2017).

Los polisacáridos pueden presentar dos tipos de enlaces, enlaces α 1-4 y enlaces α 1-6. El primer tipo de enlace se ubica en las uniones lineales, mientras que los enlaces α 1-6 se localizan en las uniones de las ramificaciones (Fig. 10) (Hasudungan, 2017).

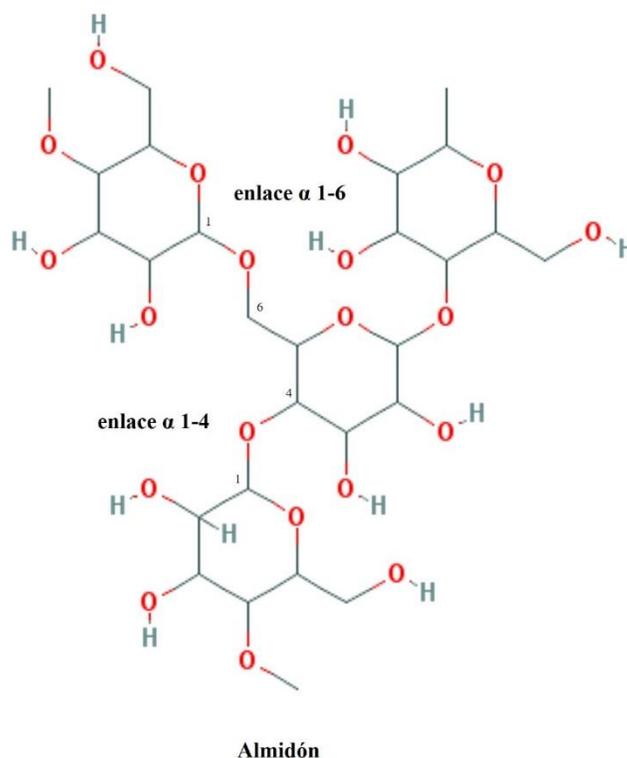


Figura 10. **Enlaces lineales y ramificados presentes en el almidón** (Tomado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017)

La sacarosa y el almidón son los componentes de mayor abundancia en la dieta, por lo que la variación en la cantidad de su consumo tiene importantes implicaciones nutricionales y de salud (Maughan, 2013). Estos carbohidratos y el resto de los que se encuentran en los alimentos, tienen que ser descompuestos hasta sus unidades más básicas, es decir, hasta monosacáridos, mediante la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, para que puedan ser aprovechados por las células del cuerpo humano (Maughan, 2013).

La hidrólisis ocurre durante el proceso de digestión, el cual comienza desde la boca, mediante la acción de las enzimas salivales denominadas α -amilasas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces α 1-4 de las uniones lineales de los carbohidratos; sin embargo, son incapaces de hidrolizar los enlaces α 1-6 de las uniones ramificadas. La hidrólisis de los polisacáridos en la boca resulta en carbohidratos más pequeños llamados oligosacáridos, cuya digestión se lleva a cabo hasta que estos llegan al intestino delgado, ya que las α -amilasas salivales son desnaturalizadas por los ácidos gástricos del estómago (Fig. 11) (Sanders, 2016).

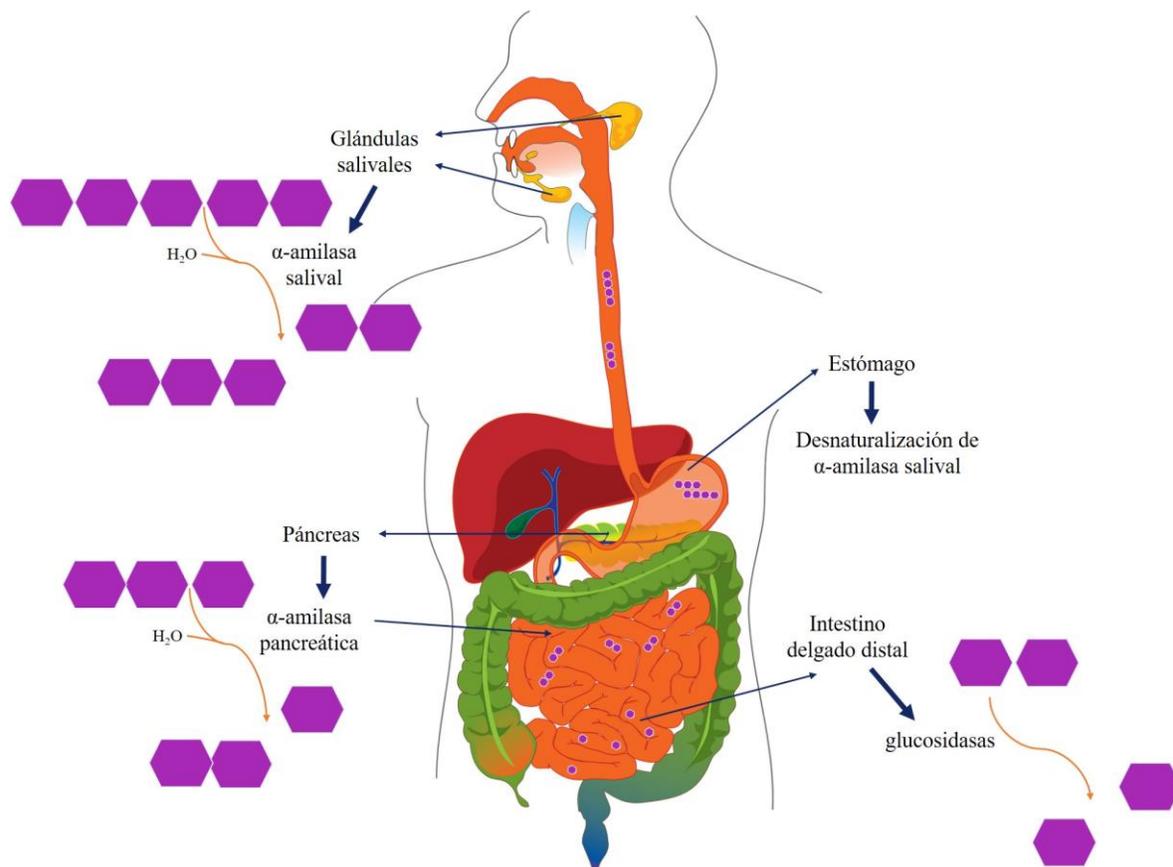


Figura 11. **Digestión de carbohidratos por las enzimas α -amilasas salivales y pancreáticas y por las enzimas glucosidasas.** Las enzimas α -amilasas salivales y pancreáticas hidrolizan los enlaces glucosídicos de los poli- y oligosacáridos en la boca e intestino delgado, respectivamente. En la región distal del intestino delgado, las glucosidasas hidrolizan los enlaces de los disacáridos, para convertirlos en monosacáridos y que puedan ser absorbidos (Adaptado de Hasudungan, 2017 y Sanders, 2016).

Una vez en el intestino delgado, específicamente en la región del duodeno, el páncreas secreta una enzima muy similar a la α -amilasa, denominada α -amilasa pancreática, la cual también tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces α 1-4 de las uniones lineales de los carbohidratos (Sanders, 2016). En regiones más distales del intestino delgado, como el yeyuno y el ileón, existen enzimas en las vellosidades de los enterocitos (células intestinales), denominadas glucosidasas, las cuales continúan con la digestión de carbohidratos a través de la hidrólisis de enlaces α 1-4 y α 1-6, obteniendo así unidades de monosacáridos a partir de oligosacáridos y disacáridos (Fig. 11) (Hasudungan, 2017).

Las enzimas glucosidasas, suelen ser clasificadas en α -glucosidasas y β - glucosidasas, según el tipo de enlace glucosídico que hidrolizan (Escandón-Rivera, 2013).

Las α -glucosidasas, sobre las que se centra la presente investigación, actúan sobre los enlaces α -glucosídicos y como resultado de la hidrólisis liberan moléculas de α -glucosa. Estas enzimas son nombradas según el tipo de sustrato sobre el que actúan, existiendo así maltasas, sacarosas, dextrinasas, glucoamilasas, entre otras (Chiba, 1997). Es posible encontrarlas en microorganismos, plantas y animales, y se clasifican en dos familias (Tabla 4) (Chiba, 1997; Escandón-Rivera, 2013).

Tabla 4. **Principales α -glucosidasas de la familia I y familia II**
(Modificado de Chiba, 1997)

Familia I	Familia II
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus niger</i> (P2)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Bacillus</i> sp. (SAM 1606)	<i>Mucor javanicus</i>
Miel de abeja (I) y (II)	<i>Candida tsukubaensis</i>
Mosquito	<i>Schwanniomyces occidentalis</i>
Mosca de la fruta: proteínas H, D y L	Intestino humano: isomaltasa, sacarasa, maltasa y lactasa
	Intestino de conejo: isomaltasa y sacarasa
	Intestino de rata: isomaltasa y sacarasa
	Remolacha azucarera, espinaca y cebada

Estas enzimas realizan diferentes funciones metabólicas en los seres vivos. Por ejemplo, en las plantas llevan a cabo la degradación del almidón presente en las semillas germinantes (Nakai *et al.*, 2007); en insectos, realizan la digestión de la celulosa (Ghadamyari *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2013) y en bacterias y hongos, llevan a cabo el proceso de degradación de oligo y disacáridos (Murray *et al.*, 2004; Kurakata *et al.*, 2008).

Cuando ha finalizado el proceso de digestión de los carbohidratos, continúa su absorción, comenzando en la primera mitad del intestino delgado, del lumen hacia el sistema circulatorio, a través de los enterocitos, en cuya región apical se encuentran dos tipos de transportadores, los Transportadores de Glucosa asociados a Sodio (SGLT, por sus siglas en inglés) y los sistemas facilitadores del transporte de glucosa GLUT 5 (Fig. 12) (Sanders, 2016).

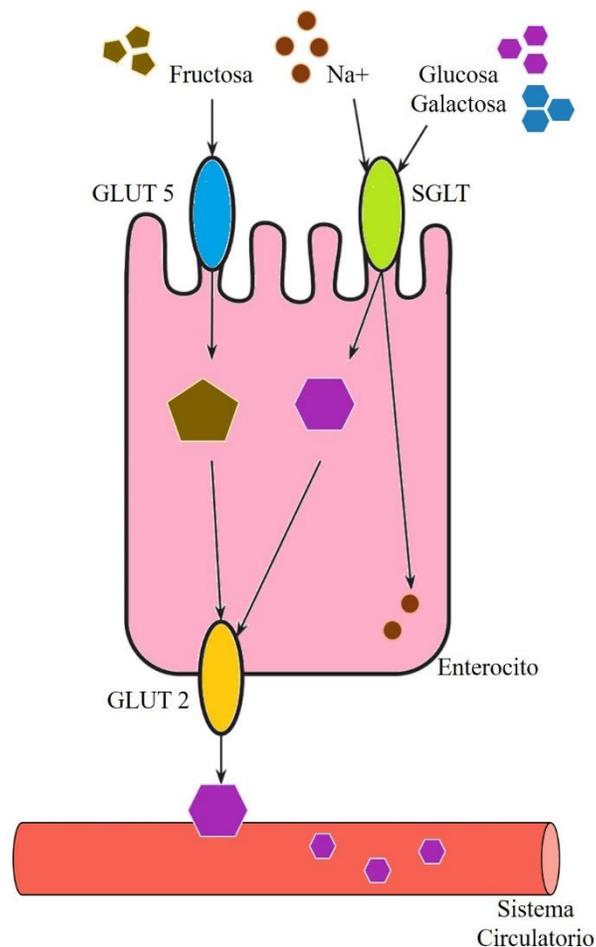


Figura 12. **Absorción de carbohidratos.** Este proceso consiste en el paso de los monosacáridos hacia el sistema circulatorio e involucra el ingreso de la fructosa por el GLUT5 y el contransporte de la glucosa y la galactosa con dos moléculas de Na^{2+} a través del SGLT hacia el enterocito. Los monosacáridos salen de los enterocitos hacia el sistema circulatorio a través de los sistemas facilitadores del transporte de glucosa GLUT2 localizados en la membrana basolateral de los enterocitos (Modificado de Sanders, 2016).

El transportador SGLT permite el paso de una molécula de glucosa o galactosa y dos de sodio (Na^+) hacia el interior del enterocito, mientras que el GLUT 5 facilita el paso de fructosa. Toda vez que los monosacáridos se encuentran dentro del enterocito, estos son transportados hacia el sistema circulatorio a través de los glucotransportadores GLUT 2, los cuales se localizan en la región basal del enterocito. De esta forma es que los carbohidratos son absorbidos para ser utilizados como energía o almacenados en forma de glucógeno (Fig.12) (Sanders, 2016; Hasudungan, 2017).

El estudio de la digestión y absorción de los carbohidratos es relevante para el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como la diabetes, ya que el retraso de uno o ambos procesos representa implicaciones benéficas en la prevención de estos padecimientos (Giacco *et al.*, 2016).

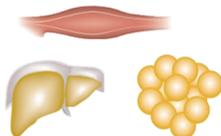
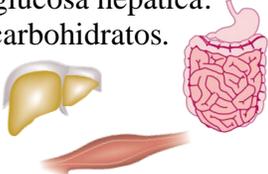
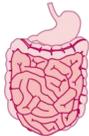
Los principales fármacos capaces de retrasar la digestión de carbohidratos son los inhibidores de α -glucosidasas, descritos más adelante. Sin embargo, algunos otros hipoglucemiantes como la metformina, a pesar de no ser su principal mecanismo de acción, también son capaces de disminuir la absorción de carbohidratos (Castro-Serna y Castro-Martínez, 2006).

3.5 TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

El tratamiento de esta enfermedad tiene como objetivo controlar y mantener la glucosa sanguínea en niveles normales, logrando esto a través del empleo de fármacos y de la implementación de una nutrición apropiada, así como de un nivel requerido de ejercicio. Además de esto, es importante modificar los factores de riesgo asociados a la diabetes para detectar y manejar las complicaciones específicas de la diabetes (Subramoniam, 2016).

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la DM2 son denominados hipoglucemiantes orales, ya que son agentes capaces de reducir los niveles de glucosa sanguínea. Estos fármacos suelen ser empleados en monoterapia o en combinación con otros fármacos (Subramoniam, 2016). En la tabla 5 se nombran los hipoglucemiantes orales de mayor uso.

Tabla 5. Principales hipoglucemiantes orales (Adaptado de Stumvoll *et al.*, 2005)

Hipoglucemiantes Orales	Mecanismo de Acción y Sitio de Acción	Fármaco
Sulfonilureas	Secretagógos de insulina. Célula β . 	Gibenclamida
Meglitinidas	Secretagógos de insulina. Célula β . 	Repaglinida
Tiazolidinedionas (TZDs)	Sensibilizadores de insulina. Músculo, hígado y tejido adiposo. 	Pioglitazona
Biguanidas	Disminuye la producción de glucosa hepática. Disminuyen la absorción de carbohidratos. Sensibilizador de insulina. Músculo, hígado e intestino 	Metformina
Inhibidores de α -glucosidasas	Retardan la absorción intestinal de carbohidratos. Intestino delgado. 	Acarbosa Voglibosa Miglitol

3.5.1 Inhibidores de α -glucosidasas

Al ser los inhibidores de α -glucosidasas el tipo de hipoglucemiantes orales estudiados en la presente investigación, su mecanismo de acción será detallado a continuación.

Los inhibidores de α -glucosidasas inhiben de forma competitiva y reversible a las enzimas α -glucosidasas que se localizan en las vellosidades de la superficie apical de los enterocitos. Mediante esta inhibición, este tipo de fármacos impiden la hidrólisis de oligosacáridos y disacáridos a monosacáridos, por lo tanto retardan la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, y por consiguiente, disminuyen los picos hiperglucémicos e hiperinsulinémicos postprandiales (Leroux-Stewart *et al.*, 2015; Wolffenbuttel y Graal, 1996).

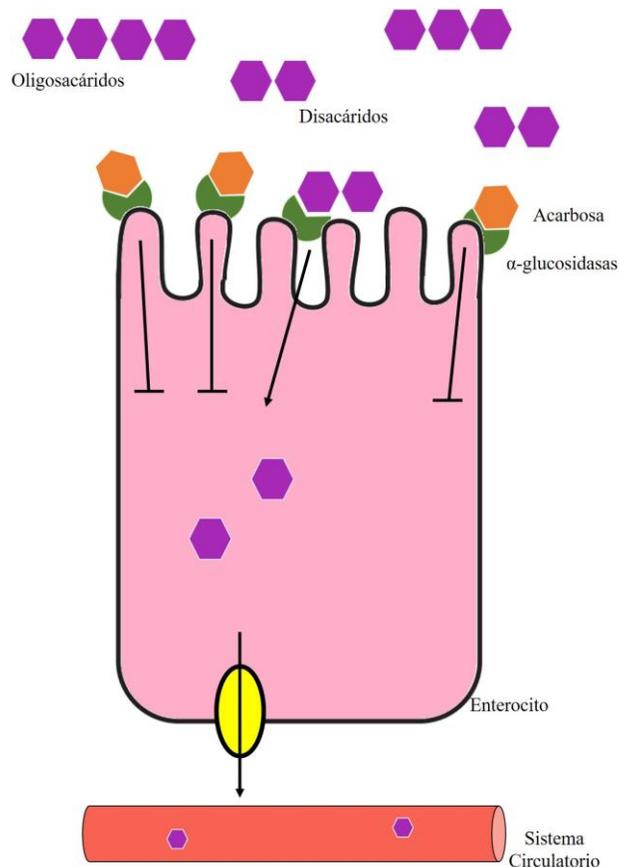


Figura 13. **Inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales y disminución de la absorción de monosacáridos.** Los fármacos inhibidores de las α -glucosidasas se unen a una serie de estas enzimas, impidiendo que sean capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos de los oligo- y disacáridos, de esta forma disminuye la cantidad de monosacáridos que ingresan al enterocito y al sistema circulatorio, con lo que el pico hiperglucémico postprandial se ve atenuado (Adaptado de Cheng y Josse, 2004).

La disminución en la absorción de los carbohidratos permiten la reducción del pico hiperglucémico postprandial, así como de los niveles de HbA1c, lo que en general mejora el control de la glucemia. Lo anterior otorga una protección al organismo contra el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y de la propia enfermedad (Stumvoll *et al.*, 2005; Wolffenbuttel y Graal, 1996).

Los tres fármacos inhibidores de α -glucosidasas disponibles a nivel mundial son miglitol, voglibosa y acarbosa (Cheng y Josse, 2004). Ya que la acarbosa es el inhibidor más utilizado y dado que proviene de una fuente natural, fue el fármaco empleado para el desarrollo del presente trabajo, por lo que será explicado a detalle a continuación.

3.5.2 Acarbosa

Algunos componentes aislados de diversas especies del género *Actinomycetes* funcionan como potentes inhibidores de α -glucosidasas, tales como sacarasa, α -amilasas y maltasas. Actualmente es distribuida mundialmente bajo diferentes nombres comerciales; no obstante, la acarbosa es el inhibidor de enzimas digestivas más utilizado a nivel mundial en el tratamiento de la DM2 (Bedekar *et al.*, 2010).

La acarbosa es un pseudotetrasacárido compuesto por una sección denominada acarviosina, la cual se compone de un ciclitol y una amino azúcar, y a la cual se encuentran ligados dos residuos de glucosa (Fig. 14) (Bedekar *et al.*, 2010).

La elevada afinidad de la acarbosa a las enzimas α -glucosidasas se debe a la similitud estructural que presenta con los oligosacáridos, gracias a sus dos residuos de glucosa. De esta forma, la acarbosa es capaz de inhibir diversas enzimas α -glucosidasas en el siguiente orden (presentados de mayor a menor afinidad): glucoamilasa > sacarasa > maltasa > isomaltasa; y además también inhibe débilmente a las α -amilasas (Bedekar *et al.*, 2010).

Menos del 2% de la dosis oral de acarbosa es absorbida de forma inalterada en el tracto gastrointestinal, mientras que el resto es degradado por enzimas digestivas intestinales y por biotransformación de microorganismos intestinales (Bedekar *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012).

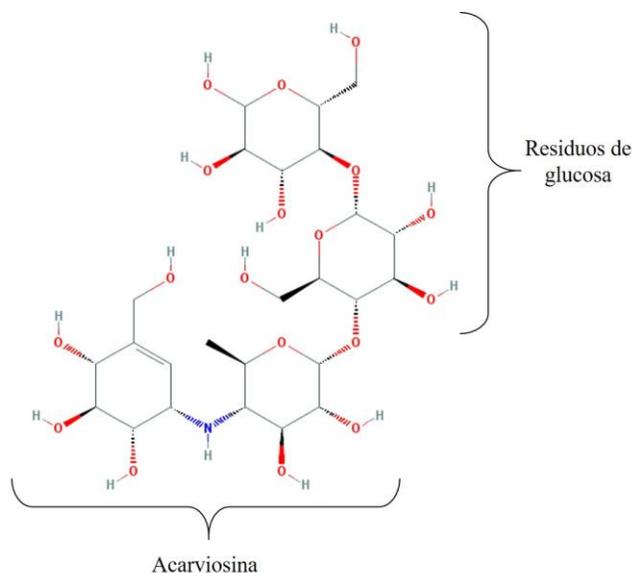


Figura 14. **Estructura química de la acarviosina** (Tomado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017).

La acarviosina es utilizada frecuentemente en combinación con otros fármacos, como las biguanidas. Una de las ventajas de este fármaco es que al ser utilizado en monoterapia no causa hipoglucemia, pues no promueven la liberación de insulina. Por otro lado, algunos de sus efectos secundarios son flatulencias, dolor abdominal y diarrea (Cheng y Josse, 2004).

3.5.3 Inhibidores de α -glucosidasas de origen natural

Las investigaciones centradas en inhibidores de α -glucosidasas provenientes de plantas medicinales han adquirido gran importancia en los últimos años (Andrade-Cetto *et al.*, 2008). Se ha determinado que entre los productos naturales con potencial actividad inhibitoria sobre las α -glucosidasas se encuentran disacáridos, iminoazúcares, tioazúcares, alcaloides polihidroxilados (piperidinas, pirrolidinas, indolizidinas y nortropanos), aminociclitoles, ciclitoles insaturados, polifenoles (flavonoides, taninos y fenilpropanoides), terpenoides, entre otros (Escandón-Rivera, 2013).

Tioazúcares como el salacinol (Fig. 15a) y el kotalanol (Fig. 15b), son productos naturales obtenidos de la especie vegetal *Salacia reticulata*, los cuales presentan casi la misma actividad inhibitoria que la acarbosa sobre las α -glucosidasas, específicamente las maltasas y las sacarosas. El macerado de la madera con agua se emplea en la medicina ayurvédica para el tratamiento de la diabetes (Escandón-Rivera, 2013).

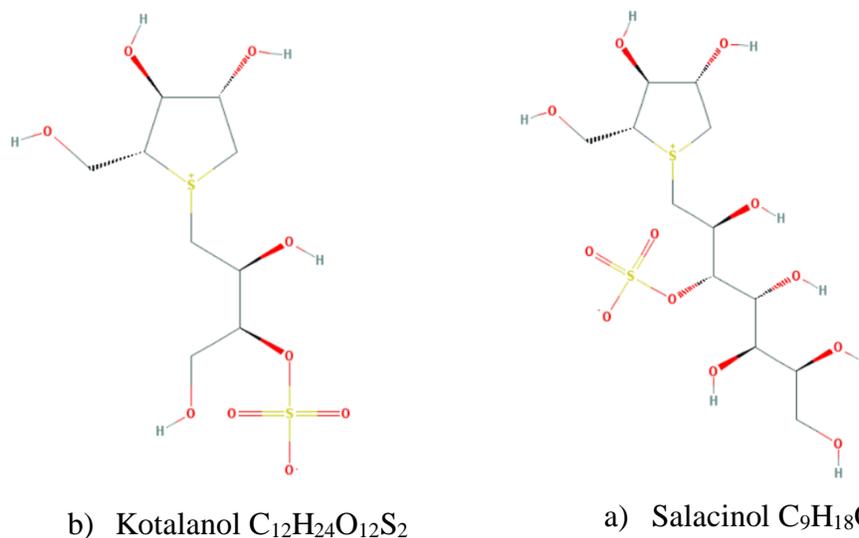


Figura 15. Estructura química de los compuestos derivados de *Salacia reticulata*: a) Salacinol y b) Kotalanol (Tomado de National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2017).

Los flavonoides y polifenoles que se encuentran presentes en muchas de las especies medicinales, son los encargados de proporcionar su actividad hipoglucemiante. Muchos de estos compuestos son capaces de inhibir a las α -glucosidasas. Algunos ejemplos son la soforaflavona, la luteolina y la apigenina que inhiben las α -glucosidasas de levadura, la baicaleina capaz de inhibir sacarosas intestinales de mamíferos, el ácido chebulágico inhibe las maltasas intestinales de mamífero y el ácido rosmarínico inhibe las α -amilasas pancreáticas porcinas (Escandón-Rivera, 2013).

La diversidad de compuestos con potencial actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas, es evidencia de lo importante que es la realización de investigaciones centradas en productos de origen natural que permitan la obtención de nuevos agentes hipoglucemiantes.

3.6 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

La búsqueda sistemática de nuevos agentes hipoglucemiantes responde a la elevada prevalencia de la diabetes, así como de las complicaciones de esta. El entendimiento de los procesos patológicos de esta enfermedad, así como la investigación de nuevos fármacos, es imprescindible para el avance en su prevención y tratamiento (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

Existen múltiples modelos animales que permiten el estudio de la DM2, estos modelos presentan características tan complejas y diversas como las propias de la enfermedad. Debido a esto, es que cada modelo cuenta con ventajas y desventajas que los hacen adecuados para ser aplicados en distintos protocolos experimentales (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

Los modelos animales utilizados para la investigación de la DM2 se clasifican en dos grandes grupos según el mecanismo por el cual se origina la enfermedad, los modelos espontáneos y los modelos inducidos. El primero de ellos proviene de animales que han sido detectados con diabetes de forma espontánea o que presentan una característica fenotípica propia de la enfermedad, y que se han mantenido mediante cruces endogámicos. Los modelos espontáneos se dividen a su vez en modelos análogos, los cuales presentan comportamientos representativos de la enfermedad; y modelos intrínsecos, los cuales portan mutaciones que originan rasgos fenotípicos similares a alguna de las manifestaciones clínicas de la DM2 (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

El segundo grupo incluye a los modelos inducidos, y como su nombre lo indica, son animales que presentan una o varias características clínicas de la enfermedad mediante la implementación de diversos métodos, por ejemplo, a través de la manipulación genética o mediante la administración de hormonas que provocan hiperglucemia o de fármacos que tienen efectos citotóxicos sobre la célula β pancreática (Arias-Díaz y Balibrea, 2007). En la tabla 6 se enlistan los tipos de modelos animales incluidos en las clasificaciones mencionadas, así como sus características principales y algunos ejemplos.

Tabla 6. **Clasificación de los modelos animales para el estudio de la DM2** (Tomado de Arias-Díaz y Balibrea, 2007)

MODELO	CARACTERÍSTICAS
I. Modelos espontáneos	
<i>I.I Modelos Análogos</i>	
- Rata Goto-Kakizaki (GK)	Presenta hiperproducción de glucosa, reducción de la tolerancia a la misma, deterioro en la secreción de insulina, aumento de la resistencia periférica a la insulina, alteración en el metabolismo lipídico y un número reducido de islotes de Langerhans al nacer. Desarrolla lesiones renales, de los nervios periféricos y de la retina.
- Ratón Obeso de Nueva Zelanda (NZO)	Presenta peso y grasa corporal elevados, resistencia a la insulina y excesiva producción de glucosa hepática. Los machos desarrollan hipertensión si son sometidos a una dieta alta en grasa y la hiperglucemia es de aparición tardía.
- Ratón KK	Presenta obesidad moderada, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia compensadora e hiperplasia de células insulares y finalmente aparece una hiperglucemia discreta.
- <i>Psammomys obesus</i> (rata israelí de la arena)	Al ser alimentado con dieta estándar de rata de laboratorio, presenta obesidad, resistencia a la insulina e hiperglucémico; mientras que con una dieta rica en colesterol desarrolla hiperlipidemia y aterosclerosis.
- Rata OLETF (<i>Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat</i>)	Este modelo se caracteriza por presentar un desarrollo tardío de la hiperglucemia, un curso crónico de la enfermedad, obesidad discreta, aparición clínica de diabetes en machos y participación de genes diabetogénicos.
<i>I.I Modelos Intrínsecos</i>	
- Ratón db/db	El gen <i>db</i> codifica una mutación puntual en el gen del receptor de la leptina, originando un déficit en la señalización de dicha hormona adipocitaria. Este modelo presenta primero hiperinsulinemia y después hipoinsulinemia, además muestra muchas características de la DM2 humana.
- Ratón Agouti	El fenotipo de este modelo es complejo, presenta obesidad y resistencia a la insulina, además de su típico color amarillo.
- Rata Zucker (fa/fa)	La mutación “fatty” (fa) ocasiona obesidad apreciable, hiperlipidemia, hipercolesterolemia e hiperinsulinemia, hipertrofia e hiperplasia adipocitaria, hiperglucemia es discreta y presenta algunas complicaciones propias de la enfermedad.

Tabla 6. (Continuación)

II. Modelos inducidos	
II.I <i>Inducción hormonal</i>	Los corticoides administrados en diferentes etapas de la vida del animal causan un estado similar al de la diabetes; además, otras hormonas como la somatostatina, el glucagon, las catecolaminas y la tiroxina son capaces de ocasionar hiperglucemia.
II.II <i>Administración de fármacos</i>	Consiste en la administración de determinadas sustancias que tienen efectos tóxicos sobre las células β pancreáticas, como la estreptozotocina (STZ) y el aloxano.
II.III <i>Manipulación genética</i>	A través de técnicas de biología molecular como sobre-expresión, eliminación y reemplazo de genes, se pueden generar manipulaciones específicas que pueden producir un modelo específico.

3.6.1 Modelo hiperglucémico STZ-NA

El modelo utilizado en el presente protocolo experimental corresponde al desarrollado por Masiello y colaboradores en 1998, el cual se basa en los efectos protectores que ejerce la nicotinamida (NA) contra las acciones β -citotóxicas altamente selectivas de la estreptozotocina (STZ) (Ghasemi *et al.*, 2014). Este modelo se ubica en la clasificación de los modelos inducidos con administración de los fármacos.

La STZ es un antibiótico producido por el hongo *Streptomyces achromogenes*. Los efectos citotóxicos de este fármaco se deben a que presenta una elevada afinidad por la membrana de la célula β , a la que ingresa a través del glucotransportador GLUT2, razón por la cual también es capaz de dañar otros órganos como riñón, hígado e intestino. La baja capacidad de la célula β de eliminar los radicales libres en combinación con la baja proporción de NAD^+ /ATP intracelular provocan la muerte de la célula, a través de procesos de necrosis y apoptosis (Fig. 16) (Szkudelski, 2001).

La NA es una vitamina con propiedades antioxidantes, razón por la cual puede reducir los efectos citotóxicos de la STZ, a través de la eliminación de radicales libres, funcionando como precursor del NAD^+ e inhibiendo a la proteína Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP1), la cual se encuentra sobreestimulada debido a la acción de la STZ (Fig. 16) (Ghasemi *et al.*, 2014).

Este modelo se caracteriza por presentar claras ventajas, como el mantenimiento estable de la hiperglucemia, daño en la secreción de insulina e intolerancia a la glucosa, además responde a agentes farmacológicos como la insulina y las sulfonilureas, por lo que es un modelo adecuado para comprobar la efectividad de nuevos hipoglucemiantes, así como de complicaciones propias de la enfermedad. Adicionalmente, se observan niveles elevados de triglicéridos, una reducción en la masa celular de las células β pancreáticas y manifestaciones clínicas como polifagia y polidipsia (Ghasemi *et al.*, 2014). Algunas de sus desventajas son la falta de resistencia a la insulina, el daño potencial de las células β residuales y los posibles efectos tóxicos de la STZ sobre otros órganos (Ghasemi *et al.*, 2014).

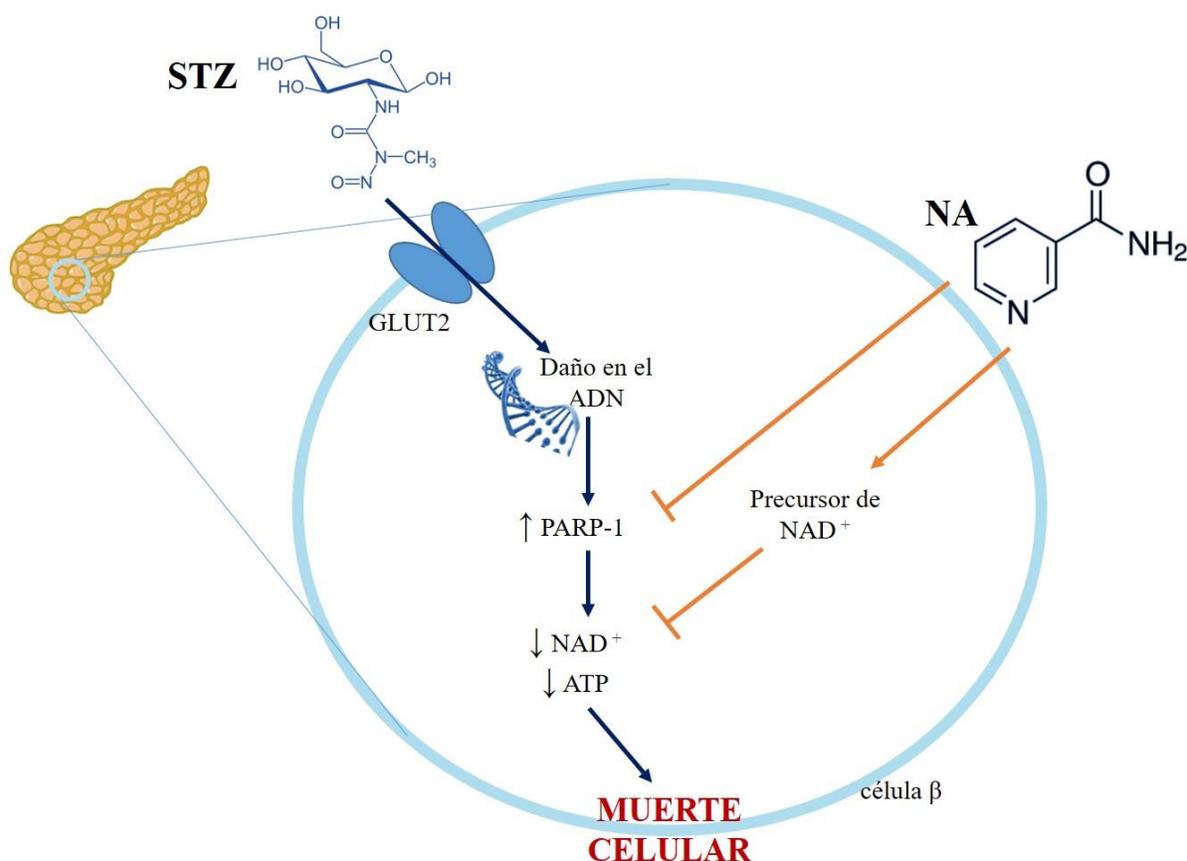


Figura 16. **Mecanismo de inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA.** La STZ ingresa a la célula β pancreática por el transportador GLUT2; las acciones intracelulares de la STZ generan daños en el ADN mediante procesos de alquilación, promoviendo la activación de la proteína PARP-1, disminuyendo la concentración intracelular de NAD⁺/ATP, ocasionando la muerte de la célula β pancreática. Por su parte, la NA inhibe la actividad de la PARP-1 y es un precursor del NAD⁺ (Adaptado de Ghasemi *et al.*, 2014; Szkudelski, 2001).

3.7 ETNOFARMACOLOGÍA

Dentro de la medicina tradicional, existe un gran número de especies vegetales utilizadas para el tratamiento de la diabetes. Estas especies son de gran interés para la investigación y el desarrollo de nuevos agentes hipoglucemiantes; sin embargo, menos de la mitad de estas plantas han sido sometidas a estudios científicos para poder validar su uso (Subramoniam, 2016).

El campo de estudio que se centra en la investigación de las plantas medicinales utilizadas por las poblaciones humanas es la etnofarmacología, la cual se define como la disciplina científica que involucra la observación, identificación, descripción e investigación experimental de los productos naturales, así como de sus efectos farmacológicos y toxicológicos (Holmstedt, 1991; Heinrich y Jäger, 2015).

Las bases científicas y culturales del uso de las plantas medicinales son de gran importancia para la investigación básica y aplicada que se realiza en México; y a pesar de la dificultad a la que se enfrenta, a través de la etnofarmacología se han logrado identificar diversos productos naturales bioactivos para el tratamiento de enfermedades comunes en las poblaciones, como desórdenes gastrointestinales, aunque también para desórdenes metabólicos emergentes, tales como la diabetes (Heinrich y Jäger, 2015).

Con 23,424 especies de plantas vasculares, México es el quinto país megadiverso de todo el mundo; de las cuales, más de 3,000 especies han sido documentadas como plantas medicinales (Heinrich y Ger, 2015). Con respecto al uso de las plantas como agentes hipoglucémicos, se han documentado al menos 306 especies mexicanas de 235 géneros (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Las plantas seleccionadas para realizar el presente estudio fueron *Eysenhardtia polystachya* Ortega (Sarg.) y *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl., las cuales se tienen registradas como especies utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes, así como agentes hipoglucemiantes utilizados en México (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Subramoniam, 2016).

3.8 *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.

Eysenhardtia polystachya (Ortega) Sarg. es una especie perteneciente a la familia Fabaceae y es conocida bajo distintos nombres comunes a lo largo del país. Por ejemplo, en Jalisco es llamada cuate, en Sinaloa se conoce como palo cuate o palo dulce, recibiendo este último nombre también en Hidalgo, Puebla, Michoacán y el Estado de México (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999).

Se trata de un arbusto caducifolio, de entre 3 y 6 m de altura, con hojas alternas, compuestas y pinnadas. Sus tallos son ramificados de color café oscuro. Su corteza externa es amarilla de textura ligeramente rugosa, mientras que la interna es de color pardo rojiza. Las inflorescencias están dispuestas en racimos espigados terminales o subterminales, presentan cáliz campanulado y corola blanca formada por 5 pétalos libres. El fruto es una vaina ligeramente curvada pubescente o subglabra; cada vaina contiene una semilla, la cual es delgada y permeable al agua (Fig. 19) (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999).



Figura 19. Ejemplar de herbario de *Eysenhardtia polystachya*.
(Tomado de Tropicos.org)

La distribución de *E. polystachya* se reporta desde el sureste de Arizona en Estados Unidos hasta el estado de Oaxaca (Fig. 20) (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999).



Figura 20. **Distribución de *Eysenhardtia polystachya***. Esta especie se distribuye desde el sureste de Arizona hasta el estado de Oaxaca en México, pasando por los estados de Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Estado de México, Nayarit, Nuevo león, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Modificado de CONABIO, 2017).

La madera de esta planta es utilizada como combustible, mientras que la parte aérea de la proporciona forraje en abundancia. En el ámbito de la medicina tradicional, *E. polystachya* es utilizada como un depurativo de la sangre, antitusivo, antiespasmódico, antidiabético, febrífugo, antiinflamatorio, antireumático y analgésico; además la madera es preparada en infusión y se le atribuyen propiedades diuréticas, contra enfermedades renales y de la vesícula (Vázquez-Yanes *et al.*, 1999; Pablo-Pérez *et al.*, 2016).

Se tienen registros del uso tradicional de sus raíces contra la diabetes (Subramoniam, 2016). Además, se tiene reporte de los efectos hipoglucemiantes de la infusión de las partes aéreas de esta planta (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Marles y Farnsworth, 1995).

Estudios fitoquímicos de *E. polystachya* indican que la corteza contiene el compuesto 9-metoxi-2,3-metilenedioxycoumestano, se encontraron además flavonoides, como las flavonas 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona y la 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavona, siendo esta última el principal constituyente del extracto metanólico del duramen (Burns *et al.*, 1984; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2002).

Del extracto acuoso de madera se aislaron también otros compuestos fenólicos, como chalconas, específicamente dos C-glucosil- α -hidroxidihidrochalconas, llamadas coatlina A y B (Beltrami *et al.*, 1982). En el extracto metanólico de corteza se separaron cuatro compuestos fenólicos conocidos: (-)-epicatequina, (+)-afzelequina, eriodictiol y (+)-quercetina-3-O-p-D-galactopiranosido. Todos estos compuestos mostraron actividad contra radicales libres, sustancias químicas que tienen un papel etiopatogénico en el desarrollo de las complicaciones de la DM (Calvo-Romero y Lima-Rodríguez, 2001; Pérez-Gutiérrez y García-Baez, 2014).

Álvarez y col. (1999) aislaron tres nuevas α -hidroxidihidrochalconas, junto con la coatlina B, de la corteza y troncos de *E. polystachya*, y en el mismo trabajo publicaron que uno de los compuestos aislados presentó actividad insecticida.

Los polifenoles y flavonoides que se encontraron presentes en los diferentes extractos de *E. polystachya*, son compuestos a los que presumiblemente se les otorga la capacidad antioxidante de esta planta (Pérez-Gutiérrez y García-Baez, 2014).

En cuanto a sus efectos farmacológicos, se comprobó que en experimentos agudos con dosis de 100, 200 y 400 mg/kg y crónicos con dosis de 400 mg/kg con ratones STZ, el extracto metanol-agua de la corteza de *E. polystachya* es capaz de reducir los niveles de la enzima glucosa-6-fostasa (G-6-Pasa), glucosa sanguínea, triglicéridos y colesterol, así como de incrementar la concentración de insulina sérica, el peso corporal y los niveles de colesterol HDL (Pérez-Gutiérrez y García-Baez, 2014; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2016).

Se comprobó el uso tradicional de esta especie como diurético, determinando que las dosis 500 y 750 mg/kg del extracto acuoso de la corteza de *E. polystachya* tuvieron actividad diurética en un modelo de rata (Pablo-Pérez *et al.*, 2016).

Algunos otros registros de la planta reportan la presencia de triterpenos, así como un efecto positivo en ratones con hiperglucemia inducida con aloxano (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

3.9 *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl.

Calea integrifolia (DC.) Hemsl. es una especie de la familia Asteraceae y pertenece al género *Calea*, en el cual se agrupan arbustos o hierbas de tallos erectos y pilosos. Sus hojas son opuestas con un peciolo corto o casi sésil. Las inflorescencias se componen de capítulos sésiles o pedunculados en agrupaciones más o menos umbeliformes (Fig. 17) (CONABIO, 2017).

Esta especie es conocida bajo los nombres de prodigiosa (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005) o amula (Martínez, 1979), así como jehuite amargoso en la comunidad de Tamala, Hidalgo, lugar donde fue colectada.

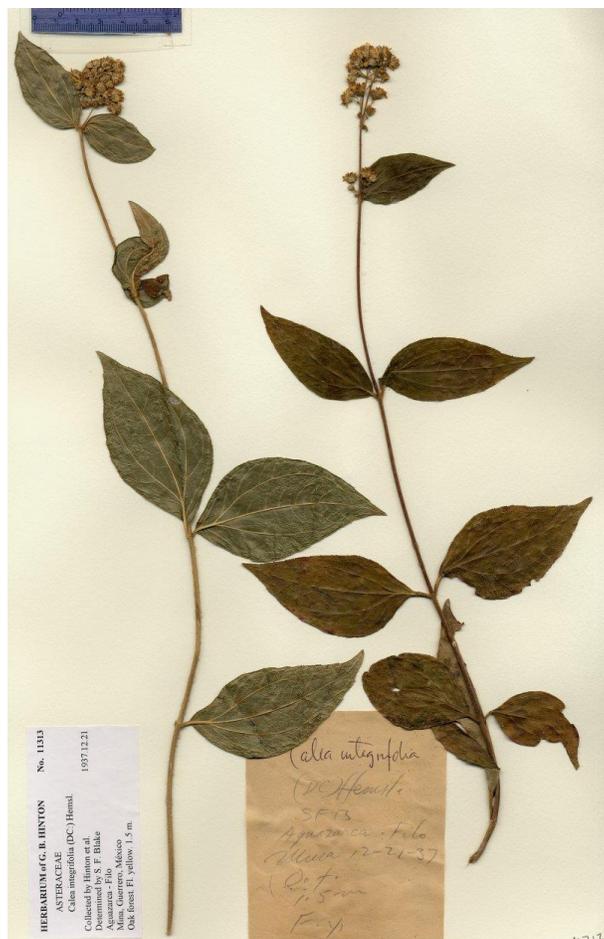


Figura 17. Ejemplar de herbario de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. (Tomado de Tropic.org)

En México, la distribución de *C. integrifolia* se reporta en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Michoacán y Veracruz. De igual forma se ha registrado su presencia en países como Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua (Fig. 18) (CONABIO, 2017).



Figura 18. **Distribución de *Calea integrifolia*.** Esta especie se distribuye en México, Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua (Modificado de CONABIO, 2017)

El uso tradicional de esta planta se ha reportado en el estado de Michoacán: “Para controlar la diabetes los curanderos también preparan un té con todo lo que se pueda conseguir de la planta llamada amula de Monterrey (*Calea integrifolia*); se toma una tacita en ayunas todos los días” (Ruiz-Méndez, 2000, p.157). Se tiene también registro del uso tradicional del tallo como infusión y de las hojas de *C. integrifolia* para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Subramoniam, 2016).

El único estudio fitoquímico de esta especie fue realizado en 1976 en el Instituto de Química Orgánica de la Universidad Técnica de Berlín, donde se encontró que la raíz de *C. integrifolia* contiene el aldehído heptadeca-2-t-9,16-trien-1-al, así como pequeñas cantidades de alcohol (Bohlmann y Zdero, 1976).

Si bien no se cuenta con antecedentes farmacológicos de esta especie, y los fitoquímicos son muy limitados, sí se han realizado este tipo de estudios en diversas especies del género *Calea*, tal es el caso de *Calea ternifolia*.

Los estudios químicos de *C. ternifolia* revelaron que los compuestos mayoritarios de la preparación tradicional de esta planta (infusión) son los cromenos **1** (6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno) y **2** (6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno), las caleínas **A** y **C**, así como flavonoides y ácido clorogénico (Escandón-Rivera *et al.*, 2017).

En cuanto a sus efectos farmacológicos, se probó que algunos de los compuestos anteriores (cromenos 1 y 2, y caleína 5) mostraron un efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas de levadura. Así mismo, se observó que el extracto acuoso de la parte aérea de *C. ternifolia* fue capaz de controlar los niveles de glucemia sanguínea postprandial y en ayuno en ratones normo e hiperglucémicos. En pruebas de tolerancia oral a la sacarosa (3 g/kg) con ratones STZ-NA, se observó que el cromeno 1 y las caleínas A y C controlaron los niveles de glucosa postprandial, con efectos comparables a los obtenidos con acarbosa (5 mg/kg). Se demostró también que el aceite esencial redujo la hiperglucemia postprandial (Escandón-Rivera *et al.*, 2017).

Otro ejemplo es la especie *C. zacatechichi*, cuya hojas se prepararon en infusión y mostraron un efecto positivo en conejos normales (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Además, a partir del extracto petrol-EtOAc (1:1) de hojas de esta especie se identificaron las siguientes flavonas: 4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona, 5,7-dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavona, 4',5,7-trihidroxiflavona, 5-hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona y 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona (Amaral *et al.*, 2017).

En el extracto metanólico de *C. zacatechichi* se identificó también la caleína A, además de la B y la D, así como germacranólidos, 8 β -angeloxi-9 α -acetiloxicaliculatolide y lactonas sesquiterpénicas, entre las que se encuentran las caleolactonas C, D y E (Amaral *et al.*, 2017). En otro estudio se caracterizó el extracto acuoso de esta misma especie, encontrando ácido clorogénico, acacetina y también germacranólidos (Sałaga *et al.*, 2016)

4. JUSTIFICACIÓN

El rápido aumento de individuos diabéticos a nivel mundial y nacional, así como la elevada incidencia de las complicaciones micro y macrovasculares debido a la hiperglucemia crónica que se origina por la diabetes ha promovido la búsqueda de nuevos fármacos que permitan controlar los niveles de glucosa sanguínea, y por consiguiente disminuir la incidencia de complicaciones.

Las plantas son una fuente importante de compuestos que poseen un amplio rango de actividades biológicas, los cuales podrían ser útiles para el desarrollo de una terapia alternativa o adyuvante de muchas enfermedades, tales como la diabetes.

Aunado a lo anterior, en México un gran porcentaje de la población recurre al uso de las plantas medicinales -con o sin prescripción médica- para el tratamiento de la diabetes. Empero, el efecto farmacológico de la gran mayoría de estas plantas no ha sido comprobado por pruebas preclínicas ni clínicas.

Debido a esto, es que el presente trabajo responde a la necesidad de recopilar información que permita sustentar el uso farmacológico de dos plantas mexicanas utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad, enfocándose en dilucidar el mecanismo de acción de su efecto hipoglucemiante.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de dos plantas mexicanas sobre la actividad *in vivo* e *in vitro* de las enzimas α -glucosidasas.

5.2 Objetivos Particulares

- Probar el efecto del extracto etanol-agua de la parte aérea de *Eysenhardtia polystachya* sobre los niveles de glucosa sanguínea postprandial a través de una curva de tolerancia oral a la sacarosa en ratas STZ-NA.
- Evaluar el efecto del extracto etanol-agua de la parte aérea de *E. polystachya* sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas provenientes de intestino de rata, a través de un ensayo *in vitro* y con el cálculo de IC₅₀.
- Evaluar el efecto del extracto etanol-agua de la parte aérea de *E. polystachya* sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas provenientes de levadura, a través de un ensayo *in vitro* y con el cálculo de IC₅₀.
- Probar el efecto del extracto acuoso de la parte aérea de *Calea integrifolia* sobre los niveles de glucosa sanguínea postprandial a través de una curva de tolerancia oral a la sacarosa en ratas STZ-NA.
- Evaluar el efecto del acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas provenientes de intestino de rata, a través de un ensayo *in vitro* y con el cálculo de IC₅₀.
- Evaluar el efecto del acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* sobre la actividad enzimática de las α -glucosidasas provenientes de levadura, a través de un ensayo *in vitro* y con el cálculo de IC₅₀.

6. HIPÓTESIS

- El extracto etanol-agua de la parte aérea de *E. polystachya* evitará el pico hiperglucémico postprandial en una curva de tolerancia oral a la sacarosa en ratas STZ-NA.
- El extracto etanol-agua de *E. polystachya* inhibirá la actividad de las α -glucosidasas provenientes de intestino de rata en un modelo *in vitro*
- El extracto etanol-agua de *E. polystachya* inhibirá la actividad de las α -glucosidasas provenientes de levadura en un modelo *in vitro*.
- El extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* evitará el pico hiperglucémico postprandial en una curva de tolerancia oral a la sacarosa en ratas STZ-NA.
- El extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* inhibirá la actividad de las α -glucosidasas provenientes de intestino de rata en un modelo *in vitro*.
- El extracto acuoso de la parte aérea de *C. integrifolia* inhibirá la actividad de las α -glucosidasas provenientes de levadura en un modelo *in vitro*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Colecta del material vegetal

E. polystachya se colectó en el estado de Hidalgo en la comunidad de Tlanchinol y corresponde al número de colecta 237, mientras que *C. integrifolia* se colectó en la comunidad de Tamala en Hidalgo y corresponde al número de colecta 238.

7.2 Elaboración de extractos vegetales y cálculo de dosis

7.2.1 Extracto etanol-agua de la parte aérea de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.

Para la elaboración del extracto etanol-agua de *E. polystachya* se empleó la parte aérea de la planta, la cual fue secada en una cámara de secado a 40°C para ser molida posteriormente. Una vez que el material vegetal fue molido, se llevó a cabo la extracción de los compuestos. La extracción consistió en mantener 20 g del material vegetal molido con 500 ml de una mezcla etanol-agua (1:1) en agitación constante durante cuatro horas a una temperatura de 35-40°C. Posteriormente se realizó una filtración con papel filtro y vacío.

Después de la filtración, el extracto líquido se rotaevaporó en un rotavapor BÜCHI hasta eliminar el etanol. El material líquido recuperado de la rotaevaporación se congeló en un congelador vertical de ultrabaja temperatura REVCO™ ULTIMAII a -40°C para ser liofilizado posteriormente en un LABCONCO FreeZone 2.5 durante 24 horas. Después de este proceso se obtuvo el extracto etanol-agua seco de *E. polystachya*.

7.2.2 Extracto acuoso de la parte aérea de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl.

Para la elaboración del extracto acuoso de *C.integrifolia* se empleó la parte aérea de la planta, la cual fue deshidratada en una cámara de secado a 40°C para ser molida posteriormente. Una vez que el material vegetal fue molido, se llevó a cabo la extracción de los compuestos. La extracción consistió en calentar 500 ml agua destilada hasta alcanzar su ebullición, se retiró la temperatura y se colocaron 20 g del material molido en agitación durante 15 minutos. Posteriormente se realizó una filtración con papel filtro y vacío.

El material líquido recuperado de la filtración se congeló en un congelador vertical de ultrabaja temperatura REVCO™ ULTIMA II a -40°C para ser liofilizado posteriormente en un LABCONCO FreeZone 2.5 durante 24 horas. Después de este proceso se obtuvo el extracto acuoso seco de *C. integrifolia*.

7.2.3 Cálculo de dosis

Para calcular la dosis que fue administrada a los animales de experimentación, se obtuvo el peso final de cada extracto, lo que equivale a los 20 g de material vegetal utilizados inicialmente. Tomando en cuenta que en campo se ha establecido que los 20 g de planta se utilizan para una persona de 70 kg, se emplea la siguiente fórmula para calcular la dosis requerida para un kg de peso:

$$\text{Dosis: } \frac{(\text{peso final del extracto g})}{70\text{kg}}: \text{g/kg}$$

7.3 Experimentación *in vivo*

7.3.1 Animales experimentales

Se empleó un total de 40 ratas (hembras y machos) de la cepa Wistar de 2 a 3 meses de edad y con un peso aproximado de 250 g. Los organismos se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo condiciones estándar de temperatura (20-25 °C) y humedad (50-55%), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y acceso a agua y alimento (Purina para Roedores de Laboratorio 5001) *ad libitum*. Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a la NOM 062-ZOO-1999 sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio.

7.3.2 Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA

La inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA se realizó según el protocolo desarrollado por Masiello y colaboradores en 1998 con algunas modificaciones.

Doce horas antes de la inducción, se privó de alimento a los animales y un día antes se llevó a cabo la preparación de la STZ a una dosis de 65 mg/kg disuelta en 1 ml/kg buffer de acetatos (0.9% de acetato de sodio, 0.1M de ácido acético) a pH 4.5; mientras que la NA se preparó el día de la inducción a una dosis de 150 mg/kg disuelta en 2 ml/kg de solución fisiológica. La inducción se realizó mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de la NA y 15 minutos después se inyectó por vía intravenosa (i.v.) la STZ por la vena caudal.

Se consideraron para el experimento aquellos organismos con una glucemia mayor o igual a 180 mg/dl.

7.3.3 Grupos experimentales

Los organismos fueron separados en cinco grupos de 8 ratas, cada uno con un tratamiento diferente (Tabla 7).

Tabla 7. Grupos experimentales con su respectivo tratamiento (n=8)

Grupo Experimental	Tratamiento
Control Normoglucémico (NG)	Sacarosa (3 g/kg)
Control Hiperglucémico (HG)	Sacarosa (3 g/kg)
Control Hiperglucémico Positivo (GHAc)	Acarbosa (3 mg/kg) y sacarosa (3 g/kg)
Hiperglucémico + <i>E. polystachya</i> (GHEp)	Extracto (8 mg/kg) y sacarosa (3 g/kg)
Hiperglucémico + <i>C. integrifolia</i> (HGCI)	Extracto (41 mg/kg) y sacarosa (3 g/kg)

7.3.4 Pruebas de tolerancia oral a la sacarosa

Para la realización de las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa, se midieron por duplicado los niveles iniciales de glucosa sanguínea (T0) con el glucómetro Accutrend® Plus mediante la extracción de una muestra sanguínea proveniente de la vena caudal, realizando un corte en la punta de la cola.

Después de obtener los valores iniciales de glucosa sanguínea se administraron los fármacos y los extractos a los animales de los grupos correspondientes, disueltos en solución fisiológica (NaCl 0.9%), según las dosis y el peso de cada organismo. La administración de sacarosa se realizó 5 minutos después, y se midió por duplicado la glucemia a los 30, 60 y 90 minutos posteriores a la última administración.

7.4 Inhibición de α -glucosidasas *in vitro*

La actividad inhibitoria del fármaco y los extractos se determinó por el método de Matsui *et al.* (1996) con algunas modificaciones. Este ensayo mide la liberación del 4-nitrofenol a partir del sustrato 4-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (4NPGP) que ocurre mediante la reacción de hidrólisis que realizan las enzimas α -glucosidasas (Fig. 21). A una mayor liberación del 4-nitrofenol, habrá una mayor intensidad de color, lo que significa que no hay inhibición de las enzimas.

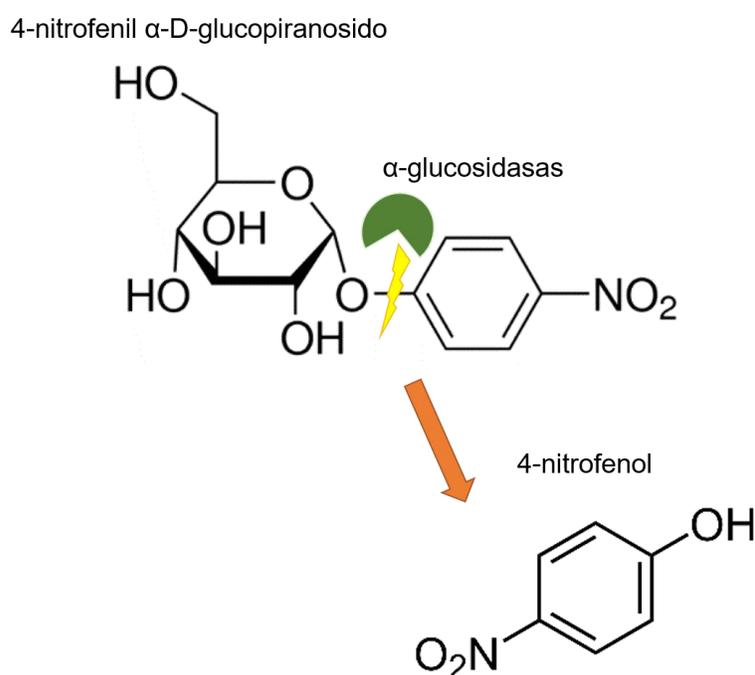


Figura 21. **Reacción de liberación del 4-nitrofenol a partir del 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido.** Si no hay inhibición de las enzimas α -glucosidasas, ocurre la reacción de hidrólisis, hay liberación de 4-nitrofenol y por lo tanto se observa una coloración (Adaptado de Matsui *et al.*, 1996).

Los ensayos se realizaron por duplicado en microplacas de pozos de 250 μ l, a los cuales se les añadió en el siguiente orden: buffer de fosfatos (PO_4) 0.1 M a pH 6.8, inhibidor (fármaco o extracto) a concentraciones de 0, 50, 200, 350 y 1000 μ g/ml, 1.1 U de α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* (SIGMA-ALDRICH) en 1 ml de buffer de fosfatos o 100 mg de liofilizado de extracto crudo de epitelio de intestino de rata (SIGMA-ALDRICH), como fuente de α -glucosidasas, disuelto en 2 ml buffer de fosfatos.

Finalmente, cada ensayo comenzó con la adición del 4NPGP (SIGMA-ALDRICH) 57.15 mM. Las reacciones se incubaron por 13 minutos y el cambio de la absorbancia fue medido a 405 nm con el espectrofotómetro BioTek Instruments Inc. modelo *ELx800* cada 30 segundos.

7.5 Análisis estadístico

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) de los datos obtenidos de las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa, se realizaron ANOVAs de una vía seguidas por pruebas de Tukey.

En cuanto al cálculo del valor de la IC_{50} de los experimentos *in vitro*, este se realizó con el método gráfico.

Los cálculos y la graficación de los datos se realizaron con el software GraphPad Prism Versión 7.03

8. RESULTADOS

8.1 Cálculo de dosis

A partir de 20 g de material vegetal de *C. integrifolia* se obtuvieron 2.87 g de extracto seco, sustituyendo en la fórmula, se obtiene la dosis por cada kg de peso:

$$\text{Dosis: } \frac{(2.87 \text{ g})}{70 \text{ kg}} : \mathbf{0.041 \text{ g/kg} = 41 \text{ mg/kg}}$$

En cuanto al extracto de *E. polystachya*, a partir de 20 g de material vegetal se obtuvieron 0.561 g de extracto seco, sustituyendo en la fórmula, se obtiene la dosis por cada kg de peso:

$$\text{Dosis: } \frac{(0.561 \text{ g})}{70 \text{ kg}} : \mathbf{0.008 \text{ g/kg} = 8 \text{ mg/kg}}$$

Estas dosis se emplearon en los tratamientos de la experimentación *in vivo*.

8.2 Pruebas de tolerancia oral a la sacarosa

Los resultados de las pruebas de tolerancia a la sacarosa oral a lo largo de 90 minutos se muestran en la tabla 8 y están expresados como el promedio de los valores de glucosa sanguínea \pm EEM (mg/dl). La figura 22 corresponde a las curvas que se obtuvieron de estas pruebas de tolerancia oral a la sacarosa, donde se grafica el nivel de glucosa plasmática (mg/dl) en los tiempos 0, 30, 60 y 90 que duró el proceso experimental

Los datos que se obtuvieron de los grupos controles (NG y HG) reflejan que la carga de sacarosa administrada ocasiona un aumento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de glucosa sanguínea del T0 al T30. Así mismo, se observa que los organismos del grupo NG son capaces de restablecer los niveles de glucosa basales al minuto 90.

Por el contrario, los valores del grupo HG durante los tiempos 60 y 90 son significativamente mayores ($p < 0.05$) al del T0, es decir, este grupo no es capaz de restablecer los niveles de glucosa basales 90 minutos después de administrar la carga de sacarosa.

Por su parte, el control positivo acarbosa demostró tener una actividad inhibitoria eficaz sobre los niveles de glucemia postprandial al no registrarse diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el T0 y el T30. Además, con la administración de este fármaco no ocurrió un aumento de la glucosa plasmática durante los tiempos 60 y 90, es decir, tampoco existió diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el T0 y el resto de los tiempos.

En lo que concierne al efecto del extracto etanol-agua de la parte aérea de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg., se observó que la administración del extracto no inhibió el pico hiperglucémico, ya que el T30 es significativamente mayor ($p < 0.05$) al T0; sin embargo, sí provocó una disminución de este, ya que los valores del T30 del grupo HGEp son significativamente menores ($p < 0.05$) a los valores del T30 del grupo HG. A pesar de ello, después de 90 minutos de haber administrado el tratamiento, no se restablecieron los valores iniciales de glucosa sanguínea, ya que se registró una diferencia significativamente mayor con respecto al T0 del mismo grupo ($p < 0.05$).

De acuerdo a lo que se obtuvo en las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa en ratas hiperglucémicas STZ-NA, se determinó que el extracto acuoso de la parte aérea de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. no inhibió el pico hiperglucémico después de administrar el tratamiento de sacarosa, ya que se obtuvieron valores significativamente mayores ($p < 0.05$) en el T30 con respecto al T0 del grupo HGCI. De igual forma, tampoco se observó una disminución del pico hiperglucémico, pues no se registró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los T30 del grupo HG y del grupo HGCI. Sin embargo, es destacable que en el T90 de este grupo se registraron valores sin diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al T0 del mismo grupo, restableciendo de este modo los niveles de glucosa basales.

Cabe destacar que tanto el extracto de *C. integrifolia*, como el de *E. polystachya*, disminuyeron los valores de glucosa sanguínea 90 minutos después de su administración al mismo nivel que el fármaco acarbosa, debido a esto fue que no se registró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de los extractos (HGCI y HGEp) y el control positivo (HGAc) en dicho tiempo.

Tabla 8. Efecto de la administración oral de los extractos de plantas y el fármaco sobre la concentración de glucosa plasmática en ratas STZ-NA con carga de sacarosa.

Tratamientos	Niveles de glucosa plasmática (mg/dl)			
	T0	T30	T60	T90
NG	123 ± 2 ^a	185 ± 2* ^a	155 ± 3* ^a	125 ± 3 ^a
HG	200 ± 6	303 ± 11*	305 ± 18*	267 ± 17*
HGAc	196 ± 3	202 ± 3 ^a	197 ± 4 ^a	195 ± 3 ^a
HGEp	188 ± 4	261 ± 7* ^{a b}	246 ± 8* ^{a b}	217 ± 7* ^a
HGCI	186 ± 3	275 ± 6* ^b	252 ± 13* ^{a b}	154 ± 8 ^a

Diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$): * con respecto al T0 de su grupo, ^a con respecto al Control Hiperglucémico y ^b de los extractos con respecto al Control Positivo (acarbosa). Los valores están expresados como promedio ± EEM, n=8. **NG** (Control Normoglucémico), **HG** (Control Hiperglucémico), **HGAc** (Control positivo Acarbosa), **HGCI** (Extracto acuoso *Calea integrifolia*) y **HGEp** (Extracto etanol-agua *Eysenhardtia polystachya*).

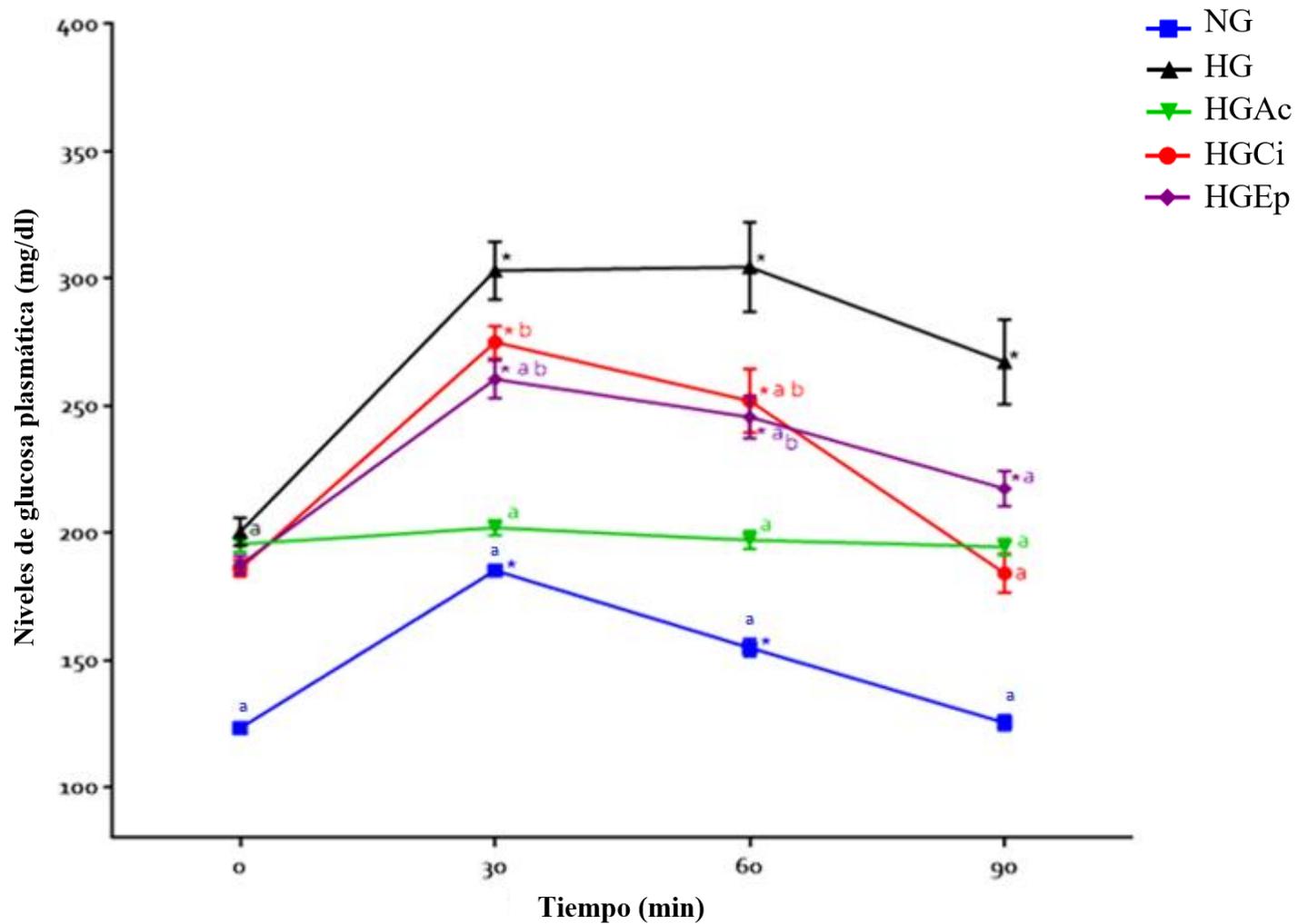


Figura 22. **Curvas resultantes de las pruebas de tolerancia a la sacarosa.** Cada punto representa la media de ocho determinaciones \pm EEM. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se representan en la figura: * con respecto al T0 de su grupo, ^a con respecto al Control Hiperglucémico y ^b de los extractos con respecto al control positivo (acarbosea). **NG:** Control Normoglucémico, **HG:** Control Hiperglucémico, **HGAc:** Control positivo Acarbosea, **HGCI:** Extracto acuoso *Calea integrifolia* y **HGEp:** Extracto etanol-agua *Eysenhardtia polystachya*.

8.3 Ensayos de la medición de la actividad *in vitro* de las α -glucosidasas

La capacidad inhibitoria del control positivo (acarbose) y de los extractos sobre la actividad *in vitro* de enzimas α -glucosidasas provenientes de intestino de rata (Tabla 9) y de levadura (Tabla 10), se expresa en términos de la IC₅₀.

En las figuras 23 y 24 se muestran las gráficas obtenidas del porcentaje de actividad enzimática con cada una de las concentraciones probadas, las cuales se expresan en términos de Log₁₀.

El fármaco acarbose ejerció actividad inhibitoria sobre ambos tipos de enzima, obteniendo un valor de la IC₅₀ de 43.7 μ g/ml en la enzima de intestino y de 114.46 μ g/ml en enzima de levadura.

Por otra parte, los extractos acuoso de *C. integrifolia* y etanol-agua de *E. polystachya* no mostraron actividad inhibitoria sobre el extracto dializado de enzima de intestino de rata liofilizado (Fig. 23) ni sobre las enzimas de *S. cerevisiae* (Fig. 24), por lo que no se obtuvieron valores de IC₅₀.

Tabla 9. Ensayo con extracto dializado de enzima de intestino de rata liofilizado.

Inhibidor	IC ₅₀ (μ g/ml)
Acarbose (10 mg)	47.22
Extracto etanol-agua <i>C. integrifolia</i> (10 mg)	--
Extracto acuoso <i>E. polystachya</i> (10 mg)	--

Tabla 10. Ensayo con enzima de *Saccharomyces cerevisiae*

Inhibidor	IC ₅₀ (μ g/ml)
Acarbose (10 mg)	172.62
Extracto etanol-agua <i>C. integrifolia</i> (10 mg)	--
Extracto acuoso <i>E. polystachya</i> (10 mg)	--

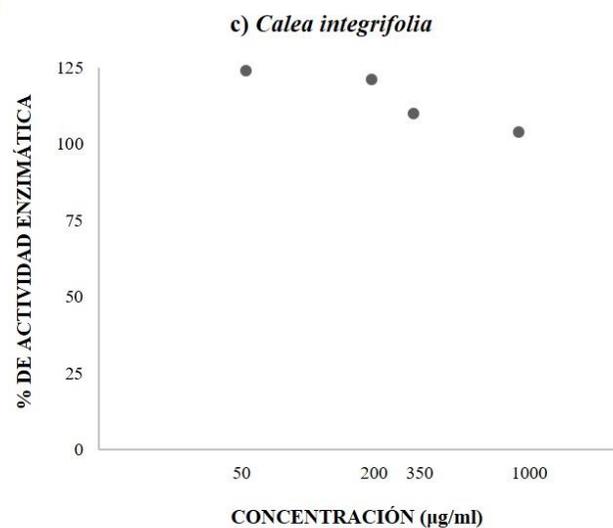
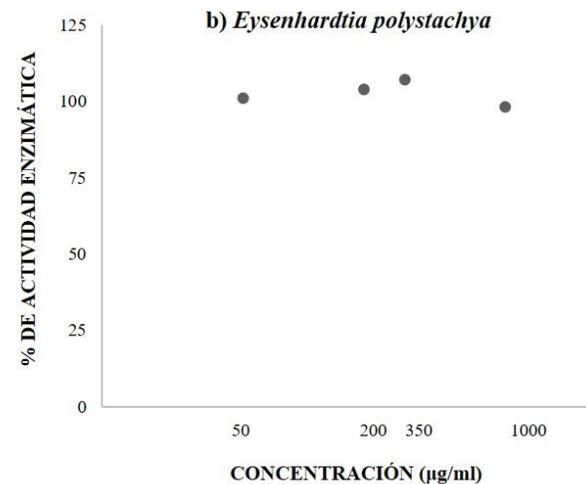
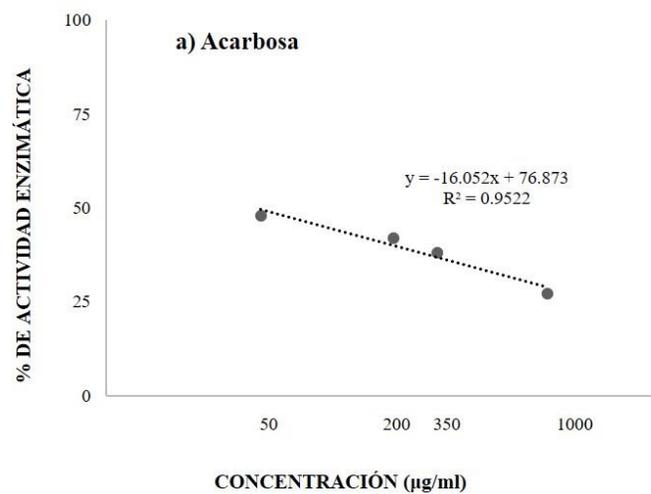


Fig. 23 Ensayo de la actividad inhibitoria de a) acarbosa, b) *Eysenhardtia polystachya* y c) *Calea integrifolia* sobre la actividad del extracto dializado de enzima de intestino de rata liofilizado. Las gráficas muestran el porcentaje de actividad enzimática vs. concentraciones logarítmicas 0.01, 1.7, 2.3, 2.5 y 3, que equivalen a las concentraciones 0, 50, 200, 350 y 1000 µg/ml de extracto de planta, respectivamente.

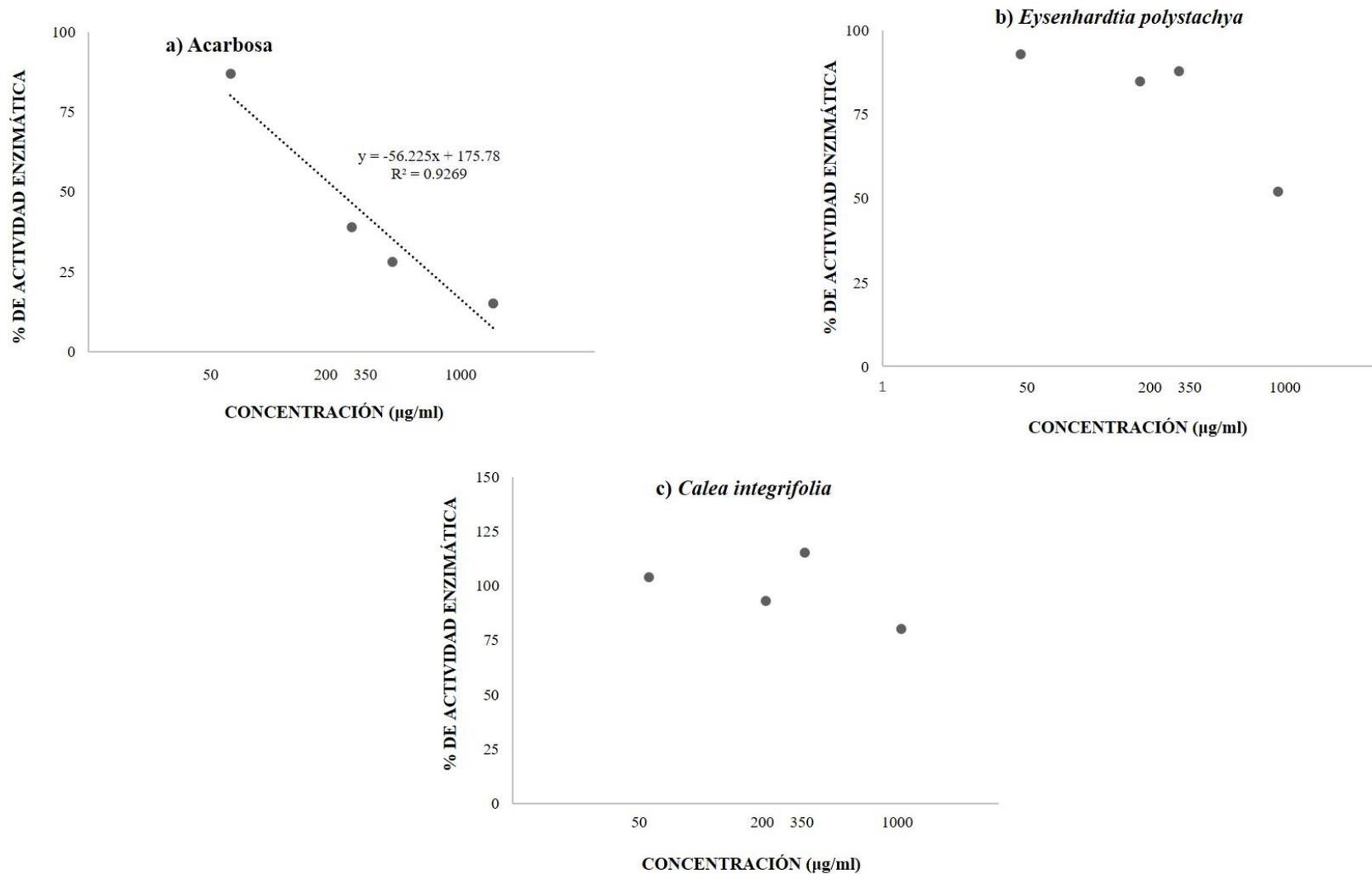


Fig. 24 Ensayo de la actividad inhibitoria de a) acarbosa, b) *Eysenhardtia polystachya* y c) *Calea integrifolia* sobre la actividad de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*. Las gráficas muestran el porcentaje de actividad enzimática vs. concentraciones logarítmicas 0.01, 1.7, 2.3, 2.5 y 3 equivalentes a las concentraciones 0, 50, 200, 350 y 1000 µg/ml, respectivamente.

9. DISCUSIÓN

Como fue reportado en la sección de resultados, la inducción de hiperglucemia mediante la aplicación del modelo STZ-NA de Masiello en ratas de la cepa Wistar fue efectiva, ya que se originó una elevación significativa de los niveles de glucosa plasmática. Lo anterior se comprobó al obtener una diferencia significativa al comparar los niveles de glucosa sanguínea del control hiperglucémico (HG) con los niveles del grupo control normoglucémico (NG).

El fármaco acarbosa demostró ser un potente inhibidor de las enzimas α -glucosidasas, pues inhibió el pico hiperglucémico postprandial en su totalidad. Se comprobó además que es un fármaco que no produce hipoglucemia, como se mencionó en los antecedentes (Cheng & Josse, 2004). Su efecto hipoglucemiante a través de la inhibición de las α -glucosidasas se ratificó con los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro*, ya que fue capaz de inhibir tanto a las enzimas de mamífero como a las de levadura. Así mismo, la IC_{50} que resultó del ensayo realizado con enzimas intestino de rata fue menor a la que se obtuvo del ensayo realizado con enzimas de *Saccharomyces cerevisiae*. Lo anterior permite comprobar que la acarbosa presenta mayor afinidad por las enzimas de origen animal, es decir, aquellas pertenecientes a la familia II (Bedekar *et al.*, 2010; Chiba, 1997).

En cuanto a los resultados obtenidos en las curvas de tolerancia oral a la sacarosa con administración del extracto etanol-agua de la parte aérea de *E. polystachya* se observó que, a pesar de no haber inhibido el pico hiperglucémico, sí hubo una reducción de este, así como una tendencia a disminuir los niveles de glucosa sanguínea durante los 90 minutos de experimentación. Es decir, se comprobó el efecto hipoglucemiante previamente observado por Pérez-Gutiérrez y García-Baez (2014).

Considerando los resultados del ensayo *in vitro* de *E. polystachya*, es posible determinar que esta especie no tiene una actividad inhibitoria sobre las enzimas α -glucosidasas, por lo que se descarta que mediante este mecanismo de acción ejerza su efecto hipoglucemiante.

Sin embargo, al tomar en cuenta que Pérez-Gutiérrez y García-Baez (2014) observaron una disminución de los niveles de la G-6-Pasa, enzima que participa en la producción de glucosa hepática (Mata-Torres Valle, 2017), se propone realizar protocolos experimentales que permitan descartar que su mecanismo de acción sea a través de la inhibición de este proceso.

Considerando el aumento en la concentración de insulina sérica observado por Pérez-Gutiérrez y García-Baez (2014) con la administración del extracto metanol-agua de *E. polystachya*, se propone determinar si esta especie actúa como un secretagógo de insulina.

Por otro lado, se observó que con una dosis de 1000 µg/ml del extracto de *E. polystachya* se alcanzó un 52% de inhibición de las α-glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, esta especie presenta cierta afinidad hacia las enzimas de la Familia I. Lo anterior, si bien no es farmacológicamente relevante, tiene importancia ecológica, pues se sabe que la presencia de metabolitos que inhiban las α-glucosidasas de insectos es un mecanismo de defensa vegetal contra la herbivoría, cuya aplicación científica permite el desarrollo de nuevos métodos para lograr el control de plagas que afectan cultivos de importancia económica (Avellaneda-Ortíz, 2013). Por lo tanto, deberá estudiarse el efecto de *E. polstachya* como un potencial control de plagas.

En lo referente al efecto del extracto acuoso de *C. integrifolia*, se observó que esta planta no tiene un efecto inhibitorio ni reductor sobre el pico hiperglucémico postprandial, contrario a lo que se obtuvo en estudios realizados con la especie *C. ternifolia* (Escandón-Rivera *et al.*, 2017). Sin embargo, es importante destacar que se emplearon compuestos aislados de *C. ternifolia*, lo que implica que con la administración del extracto de *C. integrifolia* puede generarse un efecto de antagonismo, en el que la acción del principio o de los principios activos se ve mimetizado por la interacción de los compuestos presentes en el mismo (Wagner, 2006).

La ausencia del efecto inhibitorio del extracto de *C. integrifolia* sobre la actividad de las enzimas α-glucosidasas se comprobó con los ensayos *in vitro*, en los cuales no se obtuvo un valor de IC₅₀. Es decir, se descarta este mecanismo de acción esta especie.

Es destacable que en los resultados de este estudio, se observa una disminución significativa de los niveles de glucosa sanguínea en los tiempos 60 y 90 con la administración del extracto de *C. integrifolia*. Tomando en cuenta lo anterior y considerando que Escandón-Rivera *et al.* (2017) y Sałaga *et al.* (2016) registraron la presencia de ácido clorogénico en las especies *C. ternifolia* y *C. zacatechichi*, respectivamente, es que se propone continuar con los estudios químicos del extracto de *C. integrifolia* para determinar si hay presencia de ácido clorogénico, compuesto que inhibe a la G-6-Pasa (Mata-Torres Valle, 2017) en cuyo caso se deberá considerar realizar protocolos experimentales que discrepen que el efecto hipoglucemiante que ejerce esta especie 90 minutos después de su administración sea a través de la inhibición de la producción de glucosa hepática.

A pesar de que se realizaron propuestas para probar ciertos mecanismos de acción en ambas especies, no se descartan otros procesos a través de los cuales estas especies ejercen su efecto hipoglucemiante, como la sensibilización a la insulina en músculo y/o adipocito.

10. CONCLUSIONES

A través de las pruebas de tolerancia oral a la sacarosa se determinó que las especies *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. y *Calea integrifolia* (CD.) Hemsl. no inhiben el pico hiperglucémico postprandial, pero sí disminuyen la intolerancia a la glucosa.

Los resultados de los ensayos *in vitro* realizados con enzimas de intestino de rata y de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron que estas especies no tienen un efecto inhibitorio sobre las enzimas α -glucosidasas.

A partir de lo anterior, resta concluir que estas especies deberán ser sometidas a distintos análisis farmacológicos que permitan descartar las potenciales vías de acción a través de los cuales ejercen sus efectos hipoglucemiantes. Así mismo, se destaca la importancia de realizar estudios fitoquímicos que permitan determinar su composición y cuál o cuáles de estos compuestos sean los responsables de sus efectos hipoglucemiantes.

Los resultados que se obtuvieron con esta investigación, representan un paso importante en la obtención de nuevos agentes hipoglucemiantes de origen natural a través de la comprobación de su efecto hipoglucemiante y de la dilucidación de su mecanismo de acción, demostrando la gran aportación que realiza la medicina tradicional mexicana al descubrimiento de fitomedicamentos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., y Bernal-Mizrachi, E. (2015). Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, 42, 19–41. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.12.002>

Álvarez, L. y Delgado, G. (1999) C- and O-Glycosyl- α -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry*, 50, 681–687. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00576-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00576-7)

Amaral, P. de A., Costa, F. V., Antunes, A. R., Kautz, J., Citadini-Zanette, V., Lohézic-Le Dévéhat, F., Barlow, J. y Dalbó, S. (2017). The genus *Calea* L.: A review of isolated compounds and biological activities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(33), 518–537. <https://doi.org/10.5897/JMPR2017.6412>

American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33(Supplement 1), S62–S69. <https://doi.org/10.2337/dc10-S062>

American Diabetes Association. (2017). Standards of Medical Care in Diabetes - 2017. *The Journal of Clinical and Applied Research and Education*, 40(1), 1–142. <https://doi.org/10.2337/dc16-S003>

Ampudia-Blasco, F. (2003). Fallo celular beta y progresión de la diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinol Nutr*, 50(7), 274–279. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(03\)74538-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(03)74538-0)

Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., y Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.031>

Andrade-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>

Arias-Díaz, J., y Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutricion Hospitalaria*, 22(2), 160–168. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000200005&lng=es&tlng=es

Avellaneda-Ortiz, I. M. (2013). Evaluación de la actividad inhibitoria de la α -GLUCOSIDASA (α -GLC) in vitro por extractos vegetales (Trabajo de grado). Universidad Tecnológica de Pereira. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Bedekar, A., Shah, K., y Koffas, M. (2010). Natural products for type II diabetes treatment. *Advances in applied microbiology* (Primera ed., Vol. 71). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71002-9)

Beltrami, E., De Bernardi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G., y Vita-Finzi, P. (1982). Coatline A and B, two C-Glucosyl-alfa- Hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry*, 21(12), 2931–2933. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85071-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85071-0)

Bohlmann, F., y Zdero, C. (1976). C17-Acetylenverbindungen aus *Calea integrifolia*. *Phytochemistry*, 15(7), 1177. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(76\)85125-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(76)85125-4)

Bril, V., Perkins, B., y Toth, C. (2013). Neuropathy. *Canadian Journal of Diabetes*, 37(1), 142–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2013.01.039>

Burns, D. T., Dalgarno, B. G., Gargan, P. E., y Grimshaw, J. (1984). An isoflavone and a coumestan from *eysenhardtia polystachya*-Robert Boyle's fluorescent acid-base indicator. *Phytochemistry*, 23(1), 167–169. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(84\)83100-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(84)83100-3)

Calvo-Romero, J. M., y Lima-Rodríguez, E. M. (2001). Repaglinida, un nuevo antidiabético oral. *MEDIFAM*, 11(6), 331–334. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1131-57682001000600002&lng=es&tlng=es.

Castro-Serna, D., y Castro-Martínez, M. (2006). Biguanidas. *Medicina Interna de México*, 22(5), 439–449. Recuperado el 10 Sept 2017 de <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=14661>

Cheng, A., y Josse, R. (2004). Intestinal absorption inhibitors for type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 1(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2004.06.001>

Chiba, S. (1997). Molecular mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(8), 1233–1239. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233>

CONABIO (2017) EncicloVida Recuperado el 17 Jul 2017 de <http://enciclovida.mx/especies/6052205>

CONABIO (2017) EncicloVida. Recuperado el 17 Jul 2017 de <http://enciclovida.mx/especies/6061290>

Davidson, M. B. (2011). Diagnosing diabetes with glucose criteria: Worshipping a false God. *Diabetes Care*, 34(2), 524–526. <https://doi.org/10.2337/dc10-1689>

De Fronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A. y Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>

Escandón-Rivera, S. M. (2013). Efectos hipoglucemiantes y antihiperglucémicos de preparados y compuestos de la especie *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae). (Tesis de doctorado) Universidad Nacional Autónoma de México.

Escandón-Rivera, S., Pérez-Vásquez, A., Navarrete, A., Hernández, M., Linares, E., Bye, R., y Mata, R. (2017). Anti-Hyperglycemic Activity of Major Compounds from *Calea ternifolia*. *Molecules*, 22(2): 289 <https://doi.org/10.3390/molecules22020289>

Feinglos, M., y Bethel, A. (2008). Type 2 diabetes mellitus: an evidence-based approach to practical management. Totowa, NJ: Human Press. ISBN: 978-1-60327-043-4

Ghadamyari M., Hosseiniaveh, V. y Sharifi, M. (2010). Partial biochemical characterization of α - and β -glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* walker (Lep.: Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies*. 333: 197-204 <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.12.011>

Ghasemi, A., Khalifi, S., y Jedi, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408–420. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.101.2014.4.2>

Giacco, R., Costabile, G., y Riccardi, G. (2016). Metabolic effects of dietary carbohydrates: The importance of food digestion. *Food Research International*, 88, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.026>

Goday, A. (2002). Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Revista Española de Cardiología*, 55(6), 657–70. [https://doi.org/10.1016/S0300-8932\(02\)76674-8](https://doi.org/10.1016/S0300-8932(02)76674-8)

Grupo de Trabajo Resistencia a la Insulina de la Sociedad Española de Diabetes. (2002). Resistencia a la insulina y su implicación en múltiples factores de riesgo asociados a diabetes tipo 2. *Med Clín (Barc)*, 119(12), 458–463. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)73455-6](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(02)73455-6)

Gugliucci, A. (2000). Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista de Medicina de Uruguay*, 16(1), 58–75. Recuperado de <http://www.rmu.org.uy/revista/2000v1/art9>

Guzmán-Juárez, N., y Madrigal-Bujaidar, E. (2003). Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 28(2), 14–23. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611571004> ISSN: 0185-5751

Hasudungan, A. (2017) Biology and Medicine Videos. Recuperado de <http://armandoh.org/subjects/biochemistry/>

Heinrich, M. y Jäger, A. (2015) *Ethnopharmacology*. Wiley Blackwell. West Sussex, UK (Primera ed.) ISBN: 978-1-118930748

Hiriart, M., Velasco, M., Díaz-García, C. M., Larqué, C., Sánchez-Soto, C., Albarado-Ibáñez, A., Chávez-Maldonado, J. P., Toledo, A y García-Delgado, N. (2013). Pancreatic Beta Cells in Metabolic Syndrome. *En M. S. Islam (Ed.), Islets of Langerhans* (2 ed., pp. 1–25). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6884-0>

Holmstedt. B. (1991) Historical perspective and future of ethnopharmacology, *J Ethnopharmacology*, 32(1-3), 7-24 [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90099-Y](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90099-Y)

International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas*. International Diabetes Federation (Octava). Bruselas, Bélgica: International Diabetes Federation. ISBN: 978-2-930229-87-4

Jiménez-Corona, A., Aguilar-Salinas, C. A., Rojas-Martínez, R., y Hernández-Ávila, M. (2013). Diabetes mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones para su prevención y control. *Salud Publica de Mexico*, 55, 137–143. <http://dx.doi.org/10.21149/spm.v55s2.5109>

Keane, K., y Newsholme, P. (2014). Metabolic regulation of insulin secretion. *Vitamins and Hormones The pancreatic beta cell* (Primera ed., Vol. 95). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00001-6>

Kurakata Y., Uechi, A., Yoshida, H., Kamitori, S., Sakano, Y., Nishikawa, A. y Tonzuka, T. (2008). Structural insights into the substrate specificity and function of Escherichia coli K12 YGJK, a Glucosidase belonging to the glycoside hydrolase family 63. *Journal of Molecular Biology*. 381: 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.061>

Lee, S., Chung, J. Y., Hong, K. S., Yang, S. -H., Byun, S. -Y., Lim, H. -S., Shin, S. – G., Jang, I. –J. y Yu, K. S. (2012). Pharmacodynamic comparison of two formulations of Acarbose 100-mg tablets. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 37, 553–557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2012.01339.x>

Lei Chen, Magliano, D., y Zimmet, P. (2012). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus — present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*, 8, 228–236. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.183>

Leroux-Stewart, J., Rabasa-Lhoret, R., y Chiasson, J. (2015). α -Glucosidase Inhibitors. In P. Z. y K. G. M. M. A. R. A. DeFronzo, E. Ferrannini (Ed.), *International Textbook of Diabetes Mellitus* (Cuarta, pp. 322–331). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-0273-4.50030-8>

Marles, R., y Farnsworth, N. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, 2(2), 137–189. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80059-0](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80059-0)

Martínez, M. (1979) Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. FCE, México. ISBN: 9681600118

Mata-Torres Valle, G. (2017). Efecto de los extractos de la corteza de *Rhizophora mangle* L. y de las hojas de *Bromelia karatas* L. sobre la gluconeogénesis hepática en ratas STZ-NA. (Tesis de Mestría) Universidad Nacional Autónoma de México.

Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T. y Osajima, Y. (1996) In vitro survey of α -glucosidase inhibitory food components. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(12), 2019–2022 <https://doi.org/10.1271/bbb.60.2019>

Maughan, R. (2013). Carbohydrate metabolism. *Surgery*, 31(6), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2013.04.008>

Mediavilla-Bravo, J. J. (2001). Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. *SEMERGEN*, 27(3), 132–145. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(01\)73931-7](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(01)73931-7)

Murray P., Aro, N., Collins, C., Grassick, A., Penttilä, M., Saloheimo, M. and Tuohy, M. (2004). Expression in *trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *talaromyces emersonii*. *Protein Expression and Purification*. 38(2) 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.08.006>

Nakai H., Ito, T., Hayashi, M., Kamiya, K., Yamamoto, T., Matsubara, K., Kim, Y.-M., Jintanart, W., Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., Yoshio Sano and Kimura, A. (2007). Multiple forms of α -glucosidase in rice seeds (*Oryza sativa* L., var nipponbare). *Biochimie*, 89(1), 49–62 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.014>

National Diabetes Information Clearinghouse. (2008). DCCT and EDIC: The Diabetes Control and Complications Trial and Follow-up Study. <https://doi.org/08-3874>

Olivares-Reyes, J., y Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/490/49011452003.pdf> ISSN: 1665-1995

Ortega-Hernández, L., Narváez-Morales, A., y Del Castillo-Castilla, L. (2005). Principales alteraciones de homeostasis en diabetes mellitus la. *Revista de La Facultad de Ciencias de Salud*, 22, 159–165. <http://dx.doi.org/10.21676/2389783X.300>

Pablo-Pérez, S., Estévez-Carmona, M., y Meléndez-Camargo, M. (2016). Diuretic activity of the bark of *Eysenhardtia polystachya*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11 (1), 212–217. <http://dx.doi.org/10.3329/bjp.v11i1.24659>

Pérez-Gutiérrez, R., y García-Baez, E. (2014). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and antiglycating activities of the *Eysenhardtia polystachya*. *Pharmacognosy Magazine*, 10(38) S404–S418. <https://doi.org/Doi 10.4103/0973-1296.133295>

Pérez-Gutierrez, R., Garcia-Campoy, A., y Muñoz-Ramirez, A. (2016). Properties of flavonoids isolated from the bark of *Eysenhardtia polystachya* and their effect on oxidative stress in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in mice. *Oxid Med Cell Longev*, 13. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9156510>

Pérez-Gutiérrez, R. M., Vargas-Solis, R., García-Dueñas, L. M., y Dávila-Badillo, L. (2002). Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario. *Boletín Del Colegio Mexicano de Urología*, 17(3), 134–139. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/buro/bu-2002/bu023d.pdf>

Poretzky, L. (2010). Principles of Diabetes. (L. Poretzky, Ed.) (Segunda ed). Springer. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Prasad, R., y Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes*, 6(1), 87–123. <https://doi.org/10.3390/genes6010087>

PubChem Compound Database (2017) Glucosa (CID: 79025). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/79025#section=Top>

PubChem Compound Database (2017) Fructosa (CID: 439709). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439709#section=Top>

PubChem Compound Database (2017) Galactosa (CID: 6036). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6036>

PubChem Compound Database (2017) Maltosa (CID: 6255). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6255>

PubChem Compound Database (2017) Lactosa (CID: 6134). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6134>

PubChem Compound Database (2017) Sacarosa (CID: 5988). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5988>

PubChem Compound Database (2017) Almidón (CID: 24836924). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24836924>

PubChem Compound Database (2017) Acarviosina (CID: 3083346). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3083346>

PubChem Compound Database (2017) Kotalanol (CID: 42632210). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/42632210>

PubChem Compound Database (2017) Salacinol (CID: 6451151). Recuperado el 22 Jul 2017 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6451151>

Ruiz-Méndez, T. de J. (2000) Ser curandero en Uruapan. El Colegio de Michoacán. Instituto Michoacano de Cultura. Zam, Michoacán. ISBN: 970-679-030-6

Sałaga, M., Fichna, J., Socała, K., Nieoczym, D., Pieróg, M., Zielińska, M., Kowalczyk, A., y Wlaź, P. (2016). Neuropharmacological characterization of the oneirogenic Mexican plant *Calea zacatechichi* aqueous extract in mice. *Metabolic Brain Disease*, 31, 631–641. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9794-1>

Sánchez-Rodríguez, Á. (2010). Protocolos diabetes mellitus tipo 2. (Á. Sánchez-Rodríguez, Ed.), Elsevier Doyma. Elsevier Doyma. Retrieved from <http://biblioteca.fesemi.org/handle/11119/28>

Sanders, L. (2016). Carbohydrate: Digestion , Absorption and Metabolism. In B. Caballero, P. Finglas, y F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 643–650). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00114-8>

Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, E., Truscheit, E. y Schäfer, D. (1977) *Naturwissenschaften*, 64(10): 535-536. <https://doi.org/10.1007/BF00483561>

Stumvoll, M., Goldstein, B. J., y van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(April 9), 1333–1346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)

Subramoniam, A. (2016) *Plants with anti-diabetes mellitus properties*. CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, USA (Primera ed.) ISBN: 978-1482249897

Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, 50, 537–546.

Tavera-Hernández, M., y Coyote-Estrada, N. (2006). Cetoacidosis diabética. *An Med Mex*, 51(4), 180–187. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(14\)70169-6](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(14)70169-6)

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 08 Jun 2017
<http://www.tropicos.org/Name/13009345> *Eysenhardtia polystachya*.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 08 Jun 2017
<http://www.tropicos.org/Name/2726204> *Calea integrifolia*.

Vázquez-Yanes C., Batis-Muñoz A.I., Alcocer-Silva M.I., Gual-Díaz, M. y Sánchez-Dirzo C. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y reforestación. Reporte técnico del proyecto J-084-CONABIO. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. ya http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/28-legum18m.pdf

Wagner, H. (2006). Futuro de la Investigación en fitoterapia: Tendencias y Retos. *Fitoterapia*, 6(2), 101–117. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54746291011> ISSN: 1578-7680

Watanabe S., Kakudo, A., Ohta, M., Mita, K., Fujiyama, K. y Inumaru, S. (2013). Molecular cloning and characterization of the α -glucosidase II from *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4) 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.01.005>

Wenyi Kang, Yanli Song, y Xuezhu Gu. (2012). α -glucosidase inhibitory in vitro and antidiabetic activity in vivo of *Osmanthus fragrans*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(14), 2850–2856. <https://doi.org/10.5897/JMPR011.1402>

Wolffenbuttel, B. H., y Graal, M. B. (1996). New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. *Postgrad Med J*, 72(853), 657–62. <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.72.853.657>

World Health Organization. (1985). Diabetes mellitus: Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Report Series 727, Génova, Italia. ISBN: 92-4-120727-2

World Health Organization. (2016). Perfiles de los países para la diabetes: México. Recuperado de http://www.who.int/diabetes/country-profiles/mex_es.pdf?ua=1