



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio del efecto hipoglucemiante agudo de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl en ratas STZ-NA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Omar Guillermo Yacini Torres



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Adolfo Andrade Cetto
Ciudad de México, 2019



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.

Yacini Torres Omar Guillermo

5570434306

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412062966

2. Datos del asesor.

Dr. Adolfo Andrade Cetto

3. Datos del Sinodal 1.

Dra. Sonia Marlen Escandón Rivera

4. Datos del Sinodal 2.

Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera

5. Datos del Sinodal 3.

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

6. Datos del Sinodal 4.

M. en C. Fernanda Artemisa Espinoza Hernández

7. Datos de la tesis.

Estudio del efecto hipoglucemiante agudo de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl en ratas STZ-NA

68 p.

2019

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado profesionalmente, sintiéndome muy agradecido y con un enorme orgullo de formar parte de la máxima casa de estudios del país.

A la DGAPA PAPIIT (Proyecto IN 228216) por los recursos aportados a la realización de este proyecto de investigación, igualmente agradecer por la beca otorgada.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por el espacio, tiempo, paciencia y material otorgado, y por confiar en mí en la realización del presente proyecto.

A la Dra. Sonia Escandón Rivera, por su apoyo en la parte de fitoquímica, por sus revisiones, comentarios y aportaciones al presente proyecto, por recibimiento en el laboratorio y su paciencia.

A la M. en C. Artemisa Espinoza, por asesorarme y tenerme paciencia desde el inicio del proyecto, al igual que por sus comentarios y aportaciones a la realización y edición del presente trabajo.

A la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera y al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, por sus comentarios y su tiempo otorgados a la revisión del presente proyecto.

Agradecer igualmente a los profesores, el M. en C. Gerardo Mata y al M. en C. Christian Cabello, por su asesoramiento y apoyo durante la realización del presente trabajo.

Índice

I.	Índice de figuras	5
II.	Índice de tablas.....	5
III.	Abreviaturas	6
1.	Resumen	8
2.	Introducción.....	9
3.	Antecedentes.....	11
3.1.	Diabetes mellitus	11
3.1.1	Epidemiología	14
3.1.2.	Clasificación.....	17
3.1.3.	Sintomatología y complicaciones	19
3.2.	Diabetes mellitus tipo 2	20
3.2.1	Diagnóstico DMT2	26
3.2.2.	Tratamientos DMT2	27
3.3.	Modelo de hiperglucemia inducida STZ-NA.....	30
3.4.	Fitoquímica.....	32
3.4.1	Cromatografía en Capa Fina.....	33
3.5.	Etnofarmacología	35
3.6.	<i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl. Antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos.....	37
4.	Justificación.....	41
5.	Objetivos.....	42
6.	Hipótesis.....	42
7.	Metodología	43
7.1	Colecta.....	43
7.2	Preparación del extracto acuoso de <i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl.....	43
7.3.	Animales experimentales	44
7.4	Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA	44
7.5.	Administración de tratamientos	45
7.6.	Fitoquímica – Cromatografía en capa fina	45
7.7	Análisis estadístico.....	46
8.	Resultados	47
8.1.	Cálculo de Dosis y DER	47

8.2. Estudio farmacológico	47
8.3 CCF.....	50
9. Discusión	53
10. Conclusiones y perspectivas.....	56
11. Literatura citada	57

I. Índice de figuras

		Página
Figura 1	Efectos metabólicos de la insulina en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético	11
Figura 2	Mecanismo de secreción de insulina en la célula β	12
Figura 3	Panorama mundial de la diabetes 2017 y 2045	14
Figura 4	Prevalencia de diagnóstico médico previo de diabetes en México	15
Figura 5	Papel de la insulina en el control de la homeostasis de la glucosa	19
Figura 6	Octeto ominoso en la fisiopatología de la DMT2	20
Figura 7	Disfunción de las células β y resistencia a la insulina en la patofisiología de la DMT2	22
Figura 8	Mecanismo de acción de secretagogos de insulina (sulfonilureas y meglitinidas)	28
Figura 9	Estructuras de estreptozotocina y nicotinamida	30
Figura 10	Mecanismo de acción del modelo STZ-NA	30
Figura 11	CCF	34
Figura 12	Ejemplar de herbario de <i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl	37
Figura 13	Mapa de la distribución de <i>Calea integrifolia</i> (DC.) Hemsl en México	38
Figura 14	Tablas donde se presenta el Rf de cada pico de cada carril de la placa de flavonoides glucosilados	53
Gráfico 1	Curvas de grupos sin carga de glucosa	48
Gráfico 2	Curvas de grupos con carga de glucosa	49
Gráfico 3	Cromatograma de la paca de flavonoides glucosilados	51
Imagen 1	CCF de flavonoides glucosilados	50
Imagen 2	CCF de glucósidos	51
Imagen 3	CCF de terpenos	52
Imagen 4	CCF de alcaloides	52
Imagen 5	CCF de flavonoides agliconas	52

II. Índice de tablas

Tabla 1	Criterios para la diagnosis de DMT2	25
Tabla 2	Hipoglucemiantes orales empleados en el tratamiento de DMT2	26
Tabla 3	Tratamientos de grupos sin carga de glucosa	45
Tabla 4	Tratamientos de grupos con carga de glucosa	45
Tabla 5	Fases móviles, controles y reveladores usados en cada placa de CCF	46
Tabla 6	Promedios de glucosa plasmática de grupos sin carga de glucosa	47
Tabla 7	Promedios de glucosa plasmática de grupos con carga de glucosa	48
Tabla 8	Placas y número de compuestos detectados en CCF para el extracto acuoso de <i>C. integrifolia</i>	50

III. Abreviaturas

ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ADP	Adenosín difosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATP	Adenosín trifosfato
CCF	Cromatografía en capa fina
DER	Drug extract ratio
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP4	Dipeptidil peptidasa 4
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
FID	Federación Internacional de Diabetes
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
FOXO1	Forkhead box protein 1
FPG	Glucosa plasmática en ayunos
GIP	Péptido inhibidor gástrico
GK	Glucocinasa
GLP-1	Péptido similar a glucagón 1
GLP-1R	Receptor de péptido similar a glucagón 1
GLUT	Transportador de glucosa
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GTP	Guanosín trifosfato
H	Hiper glucémico
HbA1C	Hemoglobina glicada
HE	Hiper glucémico + extracto
HEg	Hiper glucémico + extracto y glucosa
Hg	Hiper glucémico + glucosa
HG	Hiper glucémico + glibenclamida
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HLPC	Cromatografía líquida de alta resolución
HNF 4 α	Factor nuclear 4 α de hepatocito
HRg	Hiper glucémico+ repaglinida y glucosa
IL6	Interleucina 6
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INS	Insulina
IR	Receptor a insulina
IRS	Sustrato de receptor de insulina
I κ B	Cinasa I κ B
JNK	Cinasa JUN amino terminal
LADA	Diabetes autoinmune latente en adultos
MAPK	Cinases activadas por mitógenos
MODY	Diabetes de la edad madura que se presenta en el joven
MT	Medicina tradicional
N	Normoglucémico
NA	Nicotinamida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Ng	Normoglucémico + glucosa

NO	Óxido nítrico
OGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP-1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PDK-1	Proteína cinasa 1 dependiente de PIP3
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4, 5) – trisfosfato
PK	Proteína cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PN	Producto Natural
RER	Retículo endoplásmico rugoso
Rf	Factor de retención
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
STZ	Estreptozotocina
SUR1	Receptor a sulfonilurea 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
TZD	Tiazolidinediona

1. Resumen

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por la hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción y/o la acción de la insulina. Globalmente se estiman 422 millones de adultos con diabetes, siendo el 8.5% de la población adulta. En México la diabetes es una de las principales causas de muerte, y el 9.2% de los adultos ha recibido un diagnóstico de DM. La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es el principal tipo de diabetes, representando el ~90% de los casos a nivel mundial, en la cual puede presentarse ya sea una deficiencia en la secreción de insulina o una falta en la respuesta a la acción de ésta o ambas, y se debe principalmente a factores ambientales como la dieta y el sedentarismo.

A través de la etnofarmacología es posible tomar el conocimiento tradicional para desarrollar nuevas terapias que puedan ayudar al tratamiento de la DM. Reportes etnobotánicos sobre el uso tradicional de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl para el tratamiento de la DM, dan pie a la investigación farmacológica que pueda sustentar y validar el uso de la planta. El objetivo principal consistió en probar el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *C. integrifolia* en un modelo animal.

En este estudio, se usó el modelo Streptozotocina-Nicotinamida (STZ-NA) para la obtención de ratas con hiperglucemia, desarrollado por Massiello et al. (1998). Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de ambos sexos, llevándose a cabo dos estrategias experimentales: evaluándose cuatro grupos con carga de glucosa y cuatro sin carga de glucosa (n=6) en curvas temporales de glucosa con duración de dos horas. Se realizaron placas de CCF (Cromatografía en Capa Fina) para determinar qué tipo de compuestos presentó el extracto acuoso de *C. integrifolia*, y cuáles de éstos podrían ser los involucrados en el efecto hipoglucemiante de dicha planta.

Se comprobó el efecto hipoglucemiante en ratas hiperglucémicas STZ-NA en las pruebas sin carga de glucosa; observándose diferencias significativas a partir del tiempo 30. Al final de ésta los niveles disminuyeron a valores normoglucémicos. Por otro lado, el extracto no fue capaz de inhibir el pico hiperglucémico después de una carga glucosa.

En cuanto al análisis fitoquímico, se identificaron dos compuestos fenólicos con actividad hipoglucemiante conocida, ácido clorogénico y rutina. Estos, muy probablemente, se encuentran implicados en el efecto y mecanismo de acción de la planta.

2. Introducción

La diabetes mellitus (DM) se define como una elevación en los niveles de glucosa plasmática asociada con una inadecuada o ausente secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas, y que puede ocurrir con o sin una deficiencia en la señalización de insulina (ADA, 2014). Ésta, contribuye de manera significativa al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, y es la undécima causa más frecuente de discapacidad en el mundo. La DM no diagnosticada o mal controlada puede terminar en consecuencias serias como la amputación de miembros inferiores, ceguera y enfermedades renales (OMS, 2016).

Las complicaciones de la DM se pueden controlar y prevenir con éxito cuando éstas se detectan a tiempo. Realizando cambios en el estilo de vida, mejorando la dieta e incrementando la actividad física se disminuyen los riesgos de padecer la enfermedad. Desde que se presenta resistencia a la insulina o cuando la DM se encuentra en etapas más avanzadas se puede recurrir a terapias farmacológicas. Los hipoglucemiantes orales representan una de las terapias más empleadas, los cuales presentan diversos mecanismos de acción, desde estimular la secreción de insulina hasta mejorar la captación de glucosa periférica o estimular/inhibir ciertas rutas metabólicas (ADA, 2018)

De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes (FID, 2017), más de 425 millones de personas viven con DM, la mayoría adultos mayores. Se predice que el número de pacientes podría aumentar hasta los 693 millones para 2045, si las tendencias se mantienen. Además, otros 352 millones de personas presentan intolerancia a la glucosa y tienen un mayor riesgo de desarrollar DM.

Los países de medios y bajos ingresos representan la mayor parte de los casos de diabetes en el mundo. La rápida urbanización, los estilos de vida cada vez más sedentarios y las dietas poco saludables, han dado lugar a índices de obesidad y diabetes sin precedentes, provocando una epidemia mundial. México, es uno de los países con mayor incidencia de DM a nivel mundial. En 2016 se estimó que el 9.4% de los adultos padecen DM en México (ENSANUT 2016), y en 2017 la FID estimó alrededor de 12 millones de diabéticos y otras 4.5 millones de personas sin diagnosticar.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se caracteriza por una resistencia en los tejidos a la acción de la insulina, combinada con una relativa deficiencia en la secreción de esta

hormona. Un paciente con DMT2 puede presentar una predominancia en la resistencia a la insulina o una predominancia en la deficiencia de las células β , y estas anomalías pueden ser moderadas o severas (DeFronzo, 2015).

La medicina tradicional (MT) es una parte importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. Históricamente, la MT ha sido usada para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, y en específico, las enfermedades crónicas. Particularmente en las zonas de bajos recursos, la MT es culturalmente aceptada, y muchas personas confían en ella, es una forma de atención asequible, accesible y próxima a sus hogares. La MT se destaca como medio para confrontar el incesante aumento de las enfermedades no transmisibles crónicas (Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional, 2013).

Un gran número de plantas son usadas en la MT para el tratamiento de la DMT2, y aunque estas plantas pueden representar alternativas en el tratamiento de los síntomas de la DMT2, o para el desarrollo de nuevos agentes hipoglucemiantes orales, la realidad es que la información etnobotánica, química y farmacológica es escasa y ambigua. La etnofarmacología trata de entender la acción terapéutica de las plantas usadas en la MT, ayudando a mejorar las preparaciones obtenidas a partir de éstas, también tratando de apoyar el desarrollo autóctono para hacer mejor uso de estos productos (Heinrich & Gibbons, 2001).

Una de las plantas sobre la cual se tiene reporte de su uso tradicional para tratar la DM, es *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. Andrade-Cetto y Heinrich reportaron su uso en 2005, y recientemente, por parte del laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias UNAM, se reportó el uso en la localidad de Tamala en el municipio de Tepehuacán de Guerrero en el estado de Hidalgo. En este estudio se evaluó el efecto hipoglucemiante de dicha planta en un modelo animal con hiperglucemia inducida.

3. Antecedentes

3.1. Diabetes mellitus

La DM es un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por la hiperglucemia resultado por la inhabilidad del cuerpo de usar la glucosa sanguínea como energía, ya sea por defectos en la secreción de insulina por parte de las células β en el páncreas y/o la acción de ésta en tejidos blanco. La DM es causada por una interacción compleja de factores genéticos y ambientales, donde existe una desregulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada al daño a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, principalmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (ADA, 2014; Powers, 2008).

La patofisiología de la DM, desde sus descubrimientos iniciales, se encuentra relacionada a la poliuria, históricamente considerada la principal característica diagnóstica. La etimología de la palabra diabetes viene del griego antiguo diabainen, que significa atravesar o pasar, haciendo referencia a la eliminación excesiva de orina. En el siglo XVII, Willis agrega el término mellitus que proviene del latín *mel* que significa miel, refiriéndose al sabor dulce de la orina debido al exceso de glucosa. En 1889, Minkowski y von Mering relacionaron por primera vez la diabetes a un órgano en específico, el páncreas; realizando pancreatomecías en perros descubrieron que estos desarrollan síntomas de diabetes. En 1910, Sharpey-Schafer sugiere que la diabetes se debe a la deficiencia en una sustancia producida en los islotes de Langerhans a la cual llamó insulina. Más tarde, en 1921, Banting, Best y Macleod demostraron que la diabetes desarrollada en perros pancreatomecizados puede revertirse al administrar intravenosamente un extracto de los islotes de Langerhans provenientes de perros sanos. Posteriormente la insulina se purifica a partir de páncreas de origen bovino, y se usa exitosamente en pacientes en 1922 (Zaccardi et al., 2015).

Actualmente, la insulina se obtiene empleando técnicas de ingeniería genética, usando principalmente levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y bacterias (*Escherichia coli*) para su producción (Baeshen et al., 2014).

La DM se caracteriza por una disminuida tolerancia a la glucosa debido a una deficiencia en la secreción de insulina y/o a la falta de sensibilidad en los órganos blanco a la hormona, resultando en hiperglucemia. La exposición a largo plazo a concentraciones

elevadas de glucosa en los tejidos desarrolla complicaciones micro y macrovasculares (Weiss et al., 2014). Las funciones principales de la insulina son: estimular la captación de glucosa de la circulación sistémica, la inhibición de la gluconeogénesis hepática, y la inhibición de la lipólisis en el tejido adiposo (Figura. 1). En sujetos sanos, la insulina se libera de manera precisa para satisfacer la demanda metabólica. Las células β se encargan de percibir cambios en la concentración de glucosa plasmática respondiendo al liberar cantidades correspondientes de insulina. Las células β pueden reaccionar a diferentes moléculas en la circulación sistémica, incluyendo nutrientes como glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, otras hormonas, y a neurotransmisores. Las células β responden a éstos mediante una despolarización de la membrana y la subsecuente secreción de insulina (Figura. 2) (Fu et al., 2013; Weiss et al., 2014).

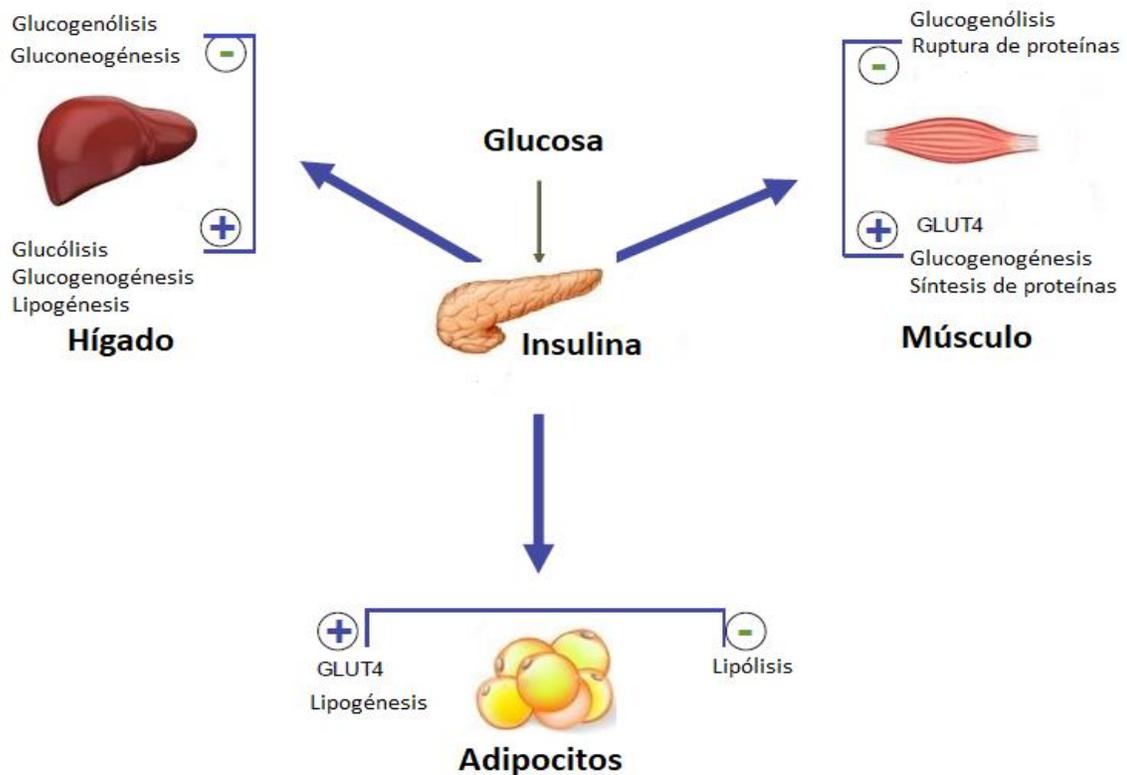


Figura 1. Efectos metabólicos de la insulina en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético. En hígado se estimula la gluconeogénesis, glucólisis y lipogénesis, se inhibe la glucogenólisis y gluconeogénesis. En músculo, se estimula la captación de glucosa, la glucogenogénesis y la síntesis de proteínas, se inhibe la ruptura de proteínas y la glucogenólisis. En adipocitos, se estimula la captación de glucosa y la lipogénesis, se inhibe la lipólisis. – inhibición; + estimulación. (Tomada y modificada a partir de Jitrapakdee S. & Forbes B. E., 2011). (+) Estimula, (-) inhibe.

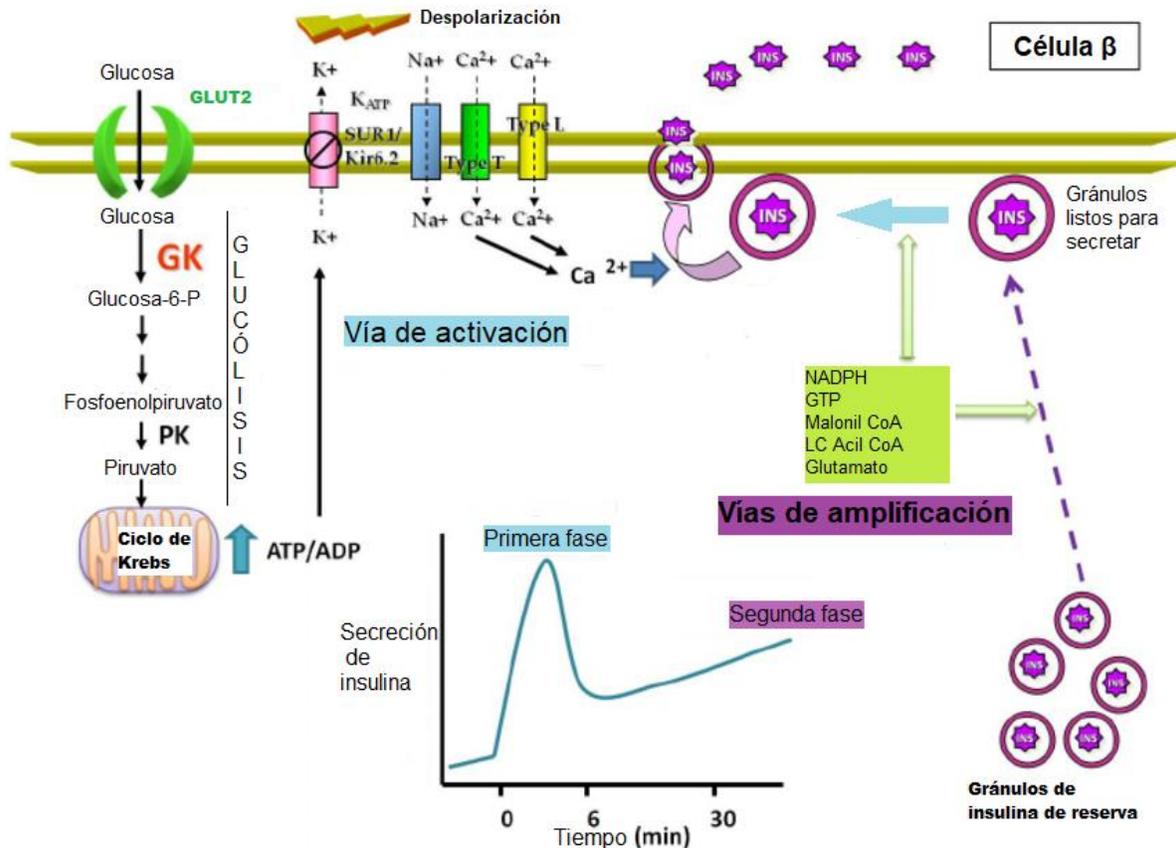


Figura 2. Mecanismo de secreción de insulina en la célula β . La glucosa exógena entra a la célula β por GLUT2, y pasa a ser metabolizada. Los niveles de ATP se elevan y provocan el cierre de canales de K^+ sensibles a ATP, permitiendo la entrada de Na^+ . La despolarización subsecuente de la membrana abre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo T, la entrada de Ca^{2+} despolariza la membrana aún más, activando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. Se incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular, se activan proteínas SNARE (secretory granule-associated small Nethylmaleimide-sensitive factor receptor, por sus siglas en inglés) permitiendo la fusión de gránulos de insulina a la membrana plasmática (primera fase de secreción). La secreción se mantiene en una segunda fase sostenida mientras más gránulos de insulina preformados en el pool de reserva son reclutados para ser secretados. La primera y segunda fase de secreción de insulina son debido a una señal dependiente e independiente de glucosa en canales de K^+ sensibles a ATP respectivamente (Rutter et al., 2015; Vega-Monroy et al., 2011). (Tomada y modificada a partir de Vega-Monroy et al., 2011).

La disfunción de las células β tiene un papel muy importante en la patogénesis de la diabetes tipo 1 y 2. La insulina es sintetizada y secretada por éstas células localizadas en los islotes de Langerhans en el páncreas, y es vital para la regulación del metabolismo en el cuerpo.

La insulina es una hormona proteica anabólica conformada de 51 residuos de aminoácidos, y compuesta por dos cadenas (A y B) unidas por dos enlaces disulfuro. El RNA maduro de la insulina codifica para una sola cadena de 110 aminoácidos, la preproinsulina, a partir de la cual el péptido amino terminal (24 aminoácidos) es escindido

por una peptidasa en el retículo endoplásmico rugoso (RER) para formar a un precursor de una sola cadena llamado proinsulina. La proinsulina es plegada en el RER formando tres enlaces disulfuro, y dando como resultado la estructura terciaria de la proinsulina. La proinsulina plegada es transportada al aparato de Golgi donde es almacenada en vesículas secretoras y escindida en insulina y péptido C (péptido de 31 aminoácidos que conecta las cadenas A y B, de 21 y 30 aminoácidos respectivamente). La insulina y péptido C son liberados en concentraciones equimolares junto con una pequeña cantidad de productos intermediarios. El péptido C es degradado más lentamente que la insulina, lo que hace que este sea un marcador útil de la secreción de insulina en la evaluación de hipoglucemia (Fu et al., 2013; Weiss et al., 2014; Subramoniam, 2016).

Los tipos de diabetes con mayor prevalencia son el tipo 1 y 2. El tipo 1 se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células- β del páncreas provocando una nula o casi nula secreción de insulina, estos pacientes se les llamaba insulino dependientes. Los sujetos con DMT2 pueden presentar ya sea una deficiencia en la secreción de insulina o una falta en la respuesta a la acción de ésta o ambas. Se presentan varias anomalías en la secreción de insulina en pacientes con DMT2, la concentración de insulina basal puede elevarse hasta el doble, principalmente debido al aumento de la glucosa plasmática, lo que eventualmente puede llevar a una disfunción de las células β . Se presenta resistencia a la insulina cuando los efectos biológicos de ésta son menores de los esperados, tanto para la disposición de glucosa en el músculo esquelético como para la inhibición de producción de glucosa endógena en el hígado, por lo tanto la producción de glucosa endógena en pacientes con DMT2 se ve acelerada (Stumvoll et al., 2005).

3.1.1 Epidemiología

La diabetes ha resultado ser un grave problema de salud pública, y el alto número de casos, así como la prevalencia de diabetes han aumentado progresivamente en las últimas décadas en todo el mundo (Forouhi et al., 2014). Se ha observado que en muchos países y regiones el aumento en la prevalencia de la diabetes se ha impulsado debido la rápida urbanización que conlleva a cambios dramáticos hacia una vida sedentaria (Cho et al., 2018). Lo anterior corresponde a un aumento en factores de riesgo, tales como la obesidad y el sobrepeso (OMS, 2016).

Globalmente se calculan alrededor de 425 millones de personas con diabetes, es decir, el 8.8% de los adultos de 20 a 79 años presenta la enfermedad. Casi el 80% vive en países de ingresos bajos y medios. Si se amplía el intervalo de 18 a 99 años, el número de

diabéticos alcanza los 451 millones. Si para el año 2045 las tendencias continúan, habrá un aproximado de 629 millones de personas con diabetes (en un intervalo de 18 a 99 años) (Figura. 3) (FID, 2017). El gasto global en salud pública en personas con diabetes alcanzó alrededor de los 850 mil millones de dólares en 2017 (Cho et al., 2018).

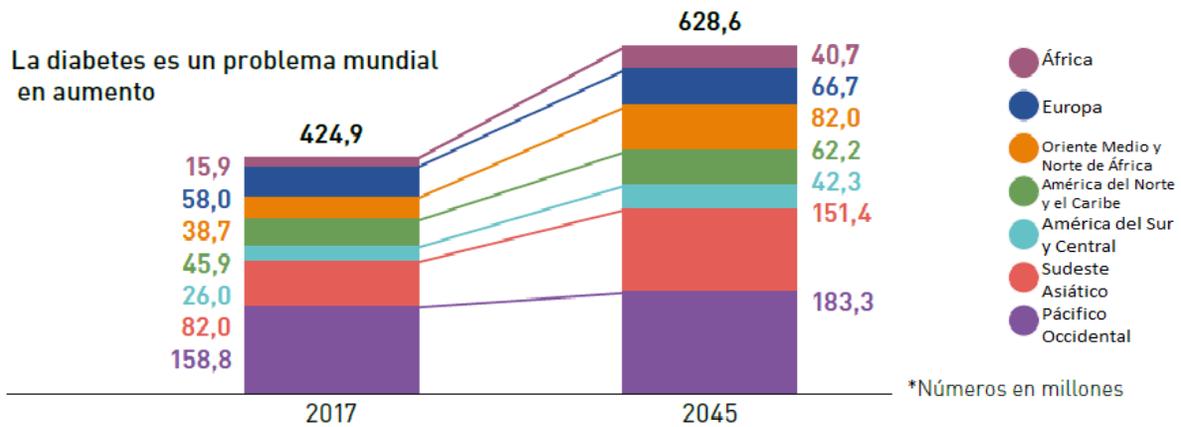
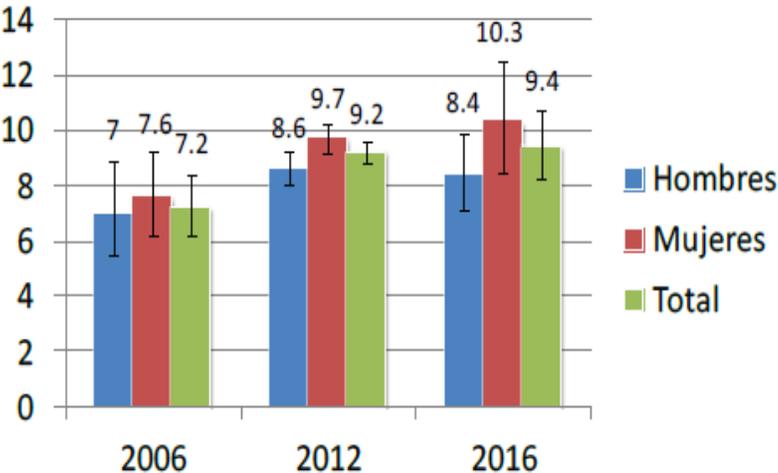


Figura 3. Panorama mundial de la diabetes 2017 y 2045. (Tomada y modificada a partir de IDF 2017).

En ningún país se han diagnosticado a todas las personas que tienen diabetes. Se tiene un estimado que en todo el mundo la mitad de las personas con diabetes (50%), hasta 212 millones, no son conscientes de presentar la enfermedad. Además, se estiman 374 millones de personas con intolerancia a la glucosa, y se proyecta que casi 21.3 millones de nacimientos vivos fueron afectados por alguna forma de hiperglucemia durante el embarazo. En 2017, aproximadamente 5 millones de muertes en todo el mundo se atribuyen a alguna forma de diabetes en un intervalo de 20 a 99 años de edad (FID, 2017; Cho et al., 2018).

Es importante resaltar, que no existen estimados globales separados para la prevalencia de diabetes tipo 1 y tipo 2. Se calcula que aproximadamente el 85% de las personas con diabetes, la mayoría adultos y de edad avanzada, son afectados por diabetes tipo 2, hasta un 12% por diabetes tipo 1 y el resto tiene otros tipos de diabetes. También se ha notado, en la última década, un incremento en la incidencia de diabetes tipo 2 en niños, especialmente aquellos pertenecientes a minorías étnicas y que provienen de familias de bajos recursos. Desafortunadamente, la diabetes tipo 2 pasa frecuentemente sin ser diagnosticada, por lo tanto, casi no hay datos sobre su verdadera incidencia (Taverna ,2018; FID, 2017).

En México, la diabetes es una de las principales causas de muerte. En 2016 se estimó que el 9.4% de los adultos recibieron un diagnóstico de diabetes, pero este porcentaje podría ser hasta el doble (Figura 4). El mayor aumento de la prevalencia de diabetes, al comparar la ENSANUT 2012 con la ENSANUT 2016, se observó entre los hombres de 60 a 69 años de edad y entre las mujeres con 60 o más años de edad. Los estados con prevalencias más altas fueron: Ciudad de México, Nuevo León, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí (ENSANUT, 2016).



Intervalos de confianza al 95%
Fuente: ENSANUT Medio Camino, 2016

Figura 4. Prevalencia de diagnóstico médico previo de diabetes en México (%). (Tomada de ENSANUT, 2016).

Durante 2011 se reportó que 70 de cada 100 mil personas murieron por diabetes a nivel nacional. Las defunciones se concentraron en la DMT2, 62% en mujeres y 61% en varones (INEGI, 2013). De la población de adultos con diagnóstico previo de diabetes, poco más del 80% recibió tratamiento, y sólo un 25 % presentó evidencia de un adecuado control metabólico. El 16% de los diabéticos en México no contó con protección en salud (servicios de salud) (FMD, 2014); mientras que el 46.4% de los diabéticos no realizó medidas preventivas para evitar o retrasar las complicaciones de la enfermedad (ENSANUT, 2016).

La FID estimó que había alrededor de 12 millones de personas con diabetes en 2017 en México, y que este número podría aumentar a 21.8 millones para el 2045. Mientras que para las personas sin diagnosticar estima que hay alrededor de 4.5 millones (FID, 2017).

3.1.2. Clasificación

Se encuentran involucrados varios procesos patogénicos durante el desarrollo de la diabetes. Ésta no es una sola enfermedad sino un conjunto de enfermedades que presentan la hiperglucemia como característica principal. En los inicios, la diabetes se asociaba principalmente al exceso de orina y se sabía que era una forma distinta de poliuria. Pero más tarde, con el descubrimiento de la insulina y el hecho de que todos los pacientes con diabetes respondieran a su administración, se creyó que la deficiencia en insulina pudiese ser la única patología. Posteriormente, se observó que existen dos tipos principales de diabetes definidos por dos características; la edad en la que la persona fue diagnosticada y si es necesaria una terapia obligatoria con insulina (ADA, 2014; Leslie et. al., 2015).

La clasificación de la diabetes ha ido cambiando conforme se comprende su patogénesis, y con el paso del tiempo parece que se hace cada vez más difícil obtener una clasificación precisa. Es por esto, que se debe mencionar algo significativo respecto a la etiología, historia, genética, heredabilidad, patofisiología, fenotipo clínico, las consecuencias y el tratamiento óptimo (Thomas & Philipson, 2015).

Hasta hace algunos años, la diabetes se dividía en dos tipos principales: la autoinmune o tipo 1 y la no autoinmune o tipo 2. Cualquier otro tipo relacionado a un desorden metabólico en la regulación de la glucosa se tomaba como otra categoría especial, principalmente relacionada al tipo 2, tales como la monogénica, la gestacional, la inducida por esteroides o relacionada a algún tipo de enfermedad (fibrosis quística, acromegalia, VIH., hepatitis C, otras). Hubo avances en la clasificación, como la evolución de la terminología de la diabetes autoinmune, pasando de llamarse diabetes juvenil, a insulino dependiente, y diabetes tipo 1 (Thomas & Philipson, 2015). Posteriormente, la DMT1 se dividió en dos: aquella positiva para anticuerpos o autoinmune (tipo 1a) y aquella negativa para anticuerpos o idiopática (tipo 1b) (Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes Mellitus Tipo 1, 2012). Igualmente, se ha mostrado que la diabetes autoinmune latente en adultos (LADA por sus siglas en inglés) se puede subdividir y puede incluir formas más sutiles de respuestas inmunes, que de otra forma se pudiese haber interpretado como diabetes tipo 2 (Thomas & Philipson, 2015). A continuación, se muestra una de las clasificaciones más usadas propuesta por la Asociación Americana de la Diabetes (2018):

Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

- I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células β , usualmente conlleva a una absoluta deficiencia de insulina).
 - A. Autoinmune (Existe una destrucción selectiva de las células β del páncreas mediada por linfocitos T activados en sujetos con haplotipos HLA de predisposición).
 - B. Idiopática (Mismas o iguales características, en los que no se encuentran datos de autoinmunidad ni haplotipos HLA de predisposición).
- II. Diabetes tipo 2 (puede ir de una predominancia en la resistencia a la insulina con relativa deficiencia en la secreción de insulina a una predominancia en la secreción de insulina con una relativa resistencia en la insulina).
- III. Otros tipos específicos
 - A. Defectos genéticos en la función de la célula β - MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young-diabetes de la edad madura que se presenta en el joven) 1 (cromosoma 20, HNF-4 α), 2 (cromosoma 7, glucocinasa), 3 (cromosoma 12, HNF-1 α), 4, 6, 7, DNA mitocondrial, diabetes neonatal transitoria, diabetes neonatal permanente, otros.
 - B. Defectos genéticos en la acción de la insulina (resistencia a insulina tipo A, diabetes lipoatrófica, síndrome Rabson-Mendenhall, otros).
 - C. Enfermedad del páncreas exocrino (pancreatitis, pancreatectomía, hemocromatosis, neoplasia, fibrosis quística, otros).
 - D. Endocrinopatías (Acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, hipertiroidismo, Somatostatina, aldosteronoma, otros).
 - E. Inducida por químicos o fármacos (Ácido nicotínico, vacor, pentamidina, glucocorticoides, hormona tiroidea, dilantina, otros).
 - F. Infecciones (Rubeola congénita, citomegalovirus).
 - G. Formas poco comunes por mediadores inmunes (síndrome de la persona rígida, anticuerpos de receptor de insulina, otros).
 - H. Otros síndromes genéticos asociados a diabetes (Síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner, síndrome de Wolfram, síndrome Prader-Willi, porfiria entre otros).
- IV. Diabetes mellitus gestacional (presentándose niveles altos de glucosa en sangre por una deficiencia en la acción de la insulina durante el embarazo).

Un sistema de clasificación debe tener la función esencial de servir como herramienta que ayude a una investigación directa, evalúe resultados, y establezca lineamientos para tener mejores prácticas en la prevención y cuidado de la enfermedad. Dar un diagnóstico

correcto o asignar un tipo de diabetes a una persona depende frecuentemente de las circunstancias del individuo en el momento del diagnóstico, por lo que a muchos diabéticos no es fácil asignarlos o clasificarlos a un tipo de diabetes en particular (Schwartz et al. 2016).

3.1.3. Sintomatología y complicaciones

Las principales manifestaciones clínicas que presenta una persona con diabetes son el aumento en la necesidad de orinar, mucha sed, aumento del apetito y pérdida de peso. Los primeros tres síntomas conocidos como poliuria, polidipsia y polifagia respectivamente (ADA, 2014; Rockefeller, 2015).

La hiperglucemia sostenida provoca una gran necesidad de orinar y beber líquidos, debido a que el cuerpo trata de eliminar el exceso de glucosa. Mientras que la resistencia a la insulina provoca un aumento en el apetito, que se debe a una disminución de la entrada de glucosa a los órganos blanco impidiendo el uso de ésta como fuente principal de energía. La pérdida de peso es un síntoma que se presenta a largo plazo debido a la obtención de energía a partir de lípidos y proteínas. La visión borrosa es otro síntoma que se presenta a largo plazo, y es consecuencia de daños en los vasos sanguíneos (Rockefeller, 2015; Holmes et. al., 2007).

Otros síntomas que se pueden observar en pacientes con DM son la fatiga, lenta recuperación de heridas como cortadas, dolor de cabeza, irritación en la piel, entre otros (Rockefeller, 2015). Un estado de hiperglucemia, aunado a la ausencia de manejo correcto, se correlaciona con afectaciones cardiovasculares, particularmente las microvasculares. La toxicidad de la glucosa induce cambios estructurales y funcionales en diversos órganos y sistemas, siendo los más relevantes en el corazón, los pequeños y grandes vasos arteriales, el riñón, el sistema nervioso central y periférico, y la retina. En consecuencia, la DM puede provocar cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, arteriosclerosis (afectando principalmente arterias distales de miembros inferiores), trastornos neurológicos centrales y periféricos, nefropatía y retinopatía (Gámiz, 2007).

3.2. Diabetes mellitus tipo 2

Como se mencionó anteriormente, la DMT2 representa la gran mayoría de los casos de diabetes aumentando la cifra de pacientes cada año y representando un grave problema de salud pública en todo el mundo. Es por lo anterior que en nuestros días sea una de las enfermedades a la cual se le asignan más recursos para su tratamiento, investigación y búsqueda de nuevos medicamentos y terapias, así como para tener un mejor entendimiento de la misma. En la DMT2 se observa un trastorno en la homeostasis de la glucosa causado por un desbalance en la producción y utilización de la misma. Un asa de retroalimentación se encarga de asegurar que se mantenga el balance de la concentración de glucosa dentro de un intervalo específico (Figura 5) (Del Prato, 2009).

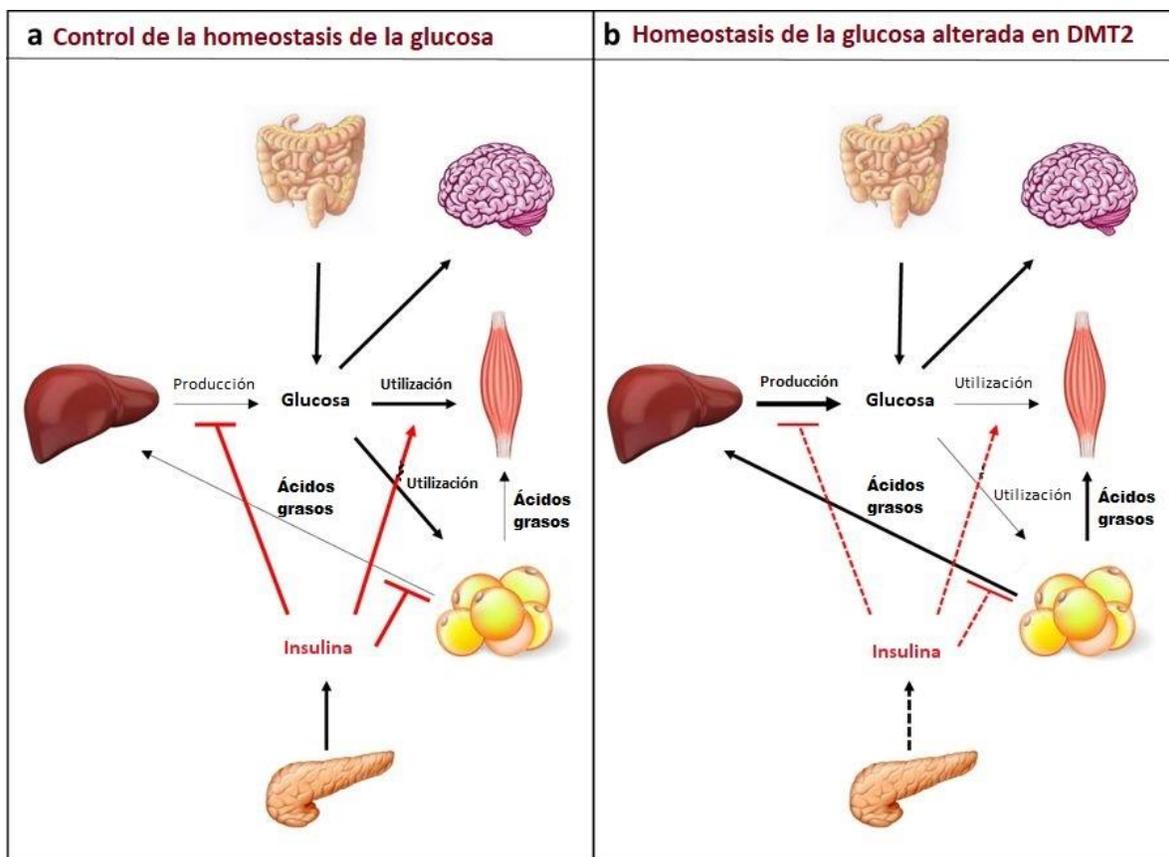


Figura 5. Papel de la insulina en el control de la homeostasis de la glucosa. **a** Después del consumo de alimentos, la glucosa es absorbida por el intestino y el aumento en los niveles de glucosa en sangre estimula la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas. La insulina inhibe la producción de glucosa hepática y estimula la captación de glucosa en el músculo esquelético y tejido adiposo para mantener la glucemia sistémica dentro de los rangos fisiológicos. La insulina también inhibe la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo favoreciendo el metabolismo de la glucosa. **b** Homeostasis de la glucosa alterada en DMT2, donde la resistencia a la insulina y la secreción de insulina alterada en las células β del páncreas participan en la hiperglucemia crónica. (Tomada y modificada a partir de Rieusset, 2018).

La homeostasis de la glucosa alterada provoca distintas respuestas fisiológicas: secreción de insulina alterada; los niveles plasmáticos en ayuno de glucagón se elevan y no regresan a la normalidad después de ingerir alimentos; la producción de glucosa hepática incrementa sin suprimirse de manera normal después del consumo de alimento; la captación de glucosa en el músculo esquelético es inadecuada; los niveles plasmáticos en ayuno de ácidos grasos libres se incrementan y tampoco disminuyen de manera normal después de la ingesta de alimento; también existe resistencia en las células β hacia los efectos estimulantes de incretinas (GLP-1, GIP) (DeFronzo, 2015).

La patofisiología de la DMT2 no está completamente dilucidada, y todavía se requiere de mucha investigación para poder llegar a comprenderla en su totalidad. Hasta ahora se conocen por lo menos ocho anomalías patofisiológicas asociadas a la DMT2, todas éstas contribuyendo a un estado de hiperglucemia sostenida (Figura 6) (Cersosimo et al., 2018; DeFronzo, 2015).

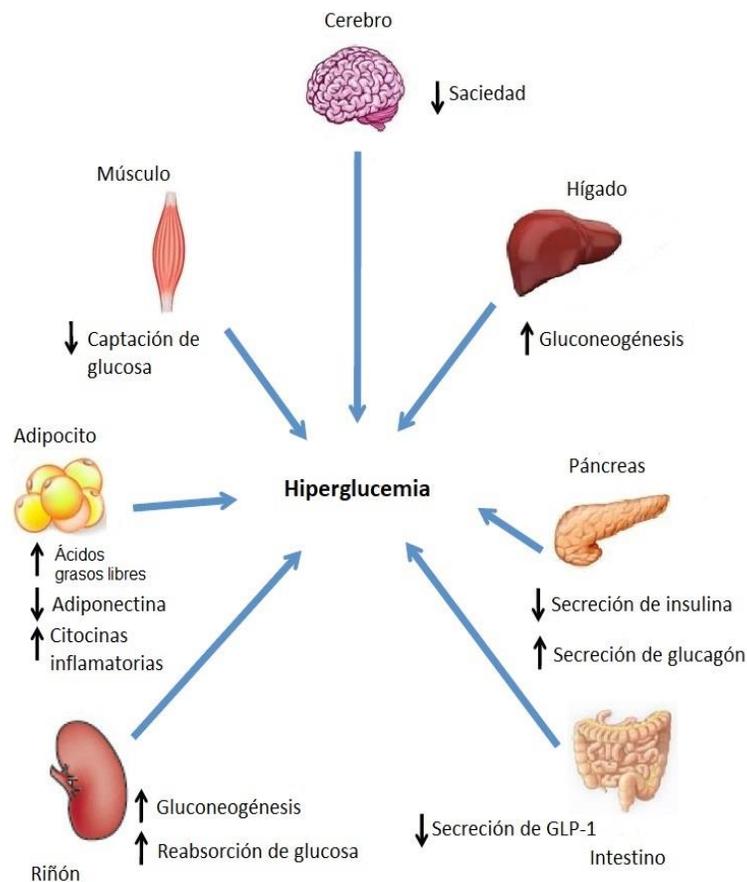


Figura 6. Octeto ominoso en la fisiopatología de la DMT2. GLP-1-péptido similar a glucagón 1 (Tomada y modificada a partir de Cornell, 2015).

El decremento en la captación de glucosa periférica combinado con el aumento en la producción endógena de glucosa en el hígado son características claras de resistencia a la insulina, pero esta condición patológica por si sola es insuficiente para causar DM2 (Szoke & Gerich, 2005). Incremento en la lipólisis, niveles altos de ácidos grasos libres, más la acumulación de metabolitos lipídicos intermediarios contribuyen a una mayor producción de glucosa mientras se reduce la utilización de glucosa periférica, y se deteriora la función de las células β (Szoke & Gerich, 2005; Cersosimo et al., 2018). En un inicio, el incremento en la secreción de insulina es suficiente para cumplir con las funciones normales para mantener la homeostasis de la glucosa, sin embargo, con el tiempo las células β se agotan y no pueden seguir satisfaciendo la demanda de insulina, resultando en una resistencia a la insulina exacerbada (Lee & Lee, 2014; Del Prato, 2009; Cersosimo et al., 2018). De manera conjunta, hay una liberación inapropiada de glucagón por parte de las células α pancreáticas durante el periodo postprandial. La deficiencia en la acción o liberación de incretinas en el tracto gastrointestinal se cree contribuye en la deficiente acción y/o secreción de la insulina, así como en la secreción excesiva de glucagón. También se ha observado que en el sistema nervioso central se disminuye la habilidad de la insulina circulante para suprimir la producción de glucosa, y la reabsorción de glucosa en los riñones se puede ver aumentada sin importar la hiperglucemia (Cersosimo et al., 2018).

La insulina, al unirse a su receptor en sus células blanco, desencadena distintas respuestas necesarias para mantener la homeostasis de la glucosa. El receptor de insulina (IR) es una glucoproteína con dos subunidades α (extracelular) y dos subunidades β (transmembranales). Cuando la insulina se une a las subunidades α del IR, el dominio interno de las subunidades β se autofosforila en residuos de tirosina (Cinasa IR), y que a su vez fosforila a los sustratos del receptor a insulina (IRS 1 al 6). Los IRSs fosforilados activan señales intracelulares como la vía PI-3K (fosfatidilinositol 3 cinasa), la cual promueve la formación de PIP3 (fosfatidilinositol (3, 4, 5) –trisfosfato), el cual recluta a Akt, PDK-1 (Proteína cinasa 1 dependiente de PIP3) y a PKC (Proteína Cinasa C) a la membrana plasmática. Akt estimula la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática, también fosforila sustratos antagonistas de la muerte celular como Bcl2e, y el factor de transcripción FOXO1 (Forkhead box protein 01, por sus siglas en inglés) (DeFronzo, 2015; Riddy, et al. 2018). La activación o inhibición de estos sustratos finalmente conlleva a efectos multifactoriales como la multiplicación y sobrevivencia de las células, síntesis de glucógeno, lipogénesis, y el control de la

expresión genética, y la alteración en alguno de los puntos de señalización de la insulina puede provocar el desarrollo de DMT2 (Mackenzie & Elliott, 2014).

El término resistencia a la insulina se refiere a la disminución de la captación de glucosa estimulada por la insulina en tejidos blanco (adiposo, músculo esquelético, hígado), y conlleva a una hiperglucemia progresiva (Figura 7) (Riddy, et al. 2018). En estados donde se presentan niveles bajos de insulina, la expresión de GLUT4 se ve reducida; por ejemplo, durante el ayuno en el músculo esquelético, y cuando se presenta resistencia a la insulina en tejido adiposo. La disfunción de GLUT4, su expresión y regulación es un factor a considerar en el desarrollo de resistencia a la insulina (AlSaraj, 2015).

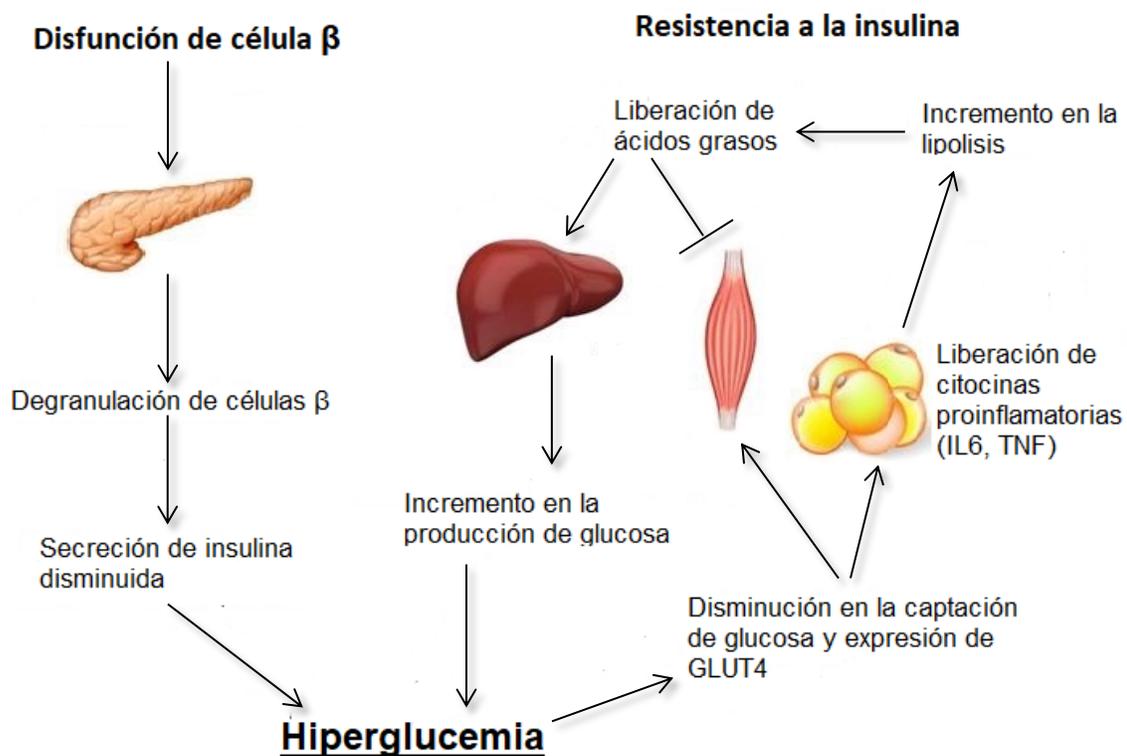


Figura 7. Disfunción de las células β y resistencia a la insulina en la patofisiología de la DMT2. (Tomada y modificada a partir de Riddy, et al. 2018).

En adipocitos, la resistencia a la insulina y la inflamación provocan la producción y liberación de ácidos grasos libres y citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL6), factor de necrosis tumoral (TNF) y resistinas. Estos factores contribuyen a la acumulación de metabolitos lipídicos tóxicos (diacilglicerol, triacilglicerol, ceramidas, acil-CoA) en miocitos y hepatocitos, desregulándose la vía de señalización PI3K, que a su vez promueve la activación de vías inflamatorias como la cinasa JUN amino terminal (JNK),

cinasa I κ B (I κ B) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), alterándose la vía de transducción de la señal de insulina. La disfunción mitocondrial predispone la acumulación de diacilglicerol y la activación de PKC, al igual que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando un incremento en el estrés del retículo endoplásmico y empeorando la resistencia a la insulina (Riddy et al. 2018; Defronzo, 2015; Lee & Lee, 2014).

Es importante notar que la DMT2 se puede desarrollar como una consecuencia de una disfunción temprana de las células β en ciertos pacientes, mientras que en otros la resistencia a la insulina precede los defectos en las células β (Færch et al., 2015).

En pacientes con DMT2, la masa de células β se ve reducida un 30-40%, esta pérdida ocurre principalmente por vías apoptóticas y autofagia desregulada. Múltiples factores contribuyen al fallo de las células β , incluyendo la edad avanzada, anomalías genéticas, la resistencia y/o deficiencia de las incretinas, la lipotoxicidad, glucotoxicidad, estrés oxidativo, resistencia a la insulina, activación de vías inflamatorias, entre otras (Defronzo, 2015). Se ha observado que la apoptosis en células β inducida por hiperglucemia tiene un rol muy importante en la patofisiología de la DMT2, donde se ve alterado el balance de proteínas proapoptóticas (Bcl-2) y proteínas antiapoptóticas (familia Bcl), revelando detalles sobre la toxicidad de la glucosa en las células β a niveles moleculares muy complejos (Tomita, 2016).

El estrés oxidativo es un factor de riesgo mayor en el desarrollo y progresión de la DMT2. Un ambiente oxidante que puede alterar la sensibilidad a la insulina, ya sea al incrementar la resistencia a la insulina o la intolerancia a la glucosa, y los mecanismos por los que ocurre, son multifactoriales y bastante complejos, involucrando varias vías de señalización celular (Rains, & Jain, 2015). El aumento en el estrés oxidativo parece ser un factor deletéreo que conlleva o promueve los factores ya mencionados, como la resistencia a la insulina, la dislipidemia (lipólisis aumentada), disfunción de células β , intolerancia a la glucosa que finalmente pueden terminar en DMT2. El estrés oxidativo crónico, la hiperglucemia y la dislipidemia son particularmente peligrosos para las células β , ya que pueden disminuir la expresión de genes clave para mantener la función de las células β e inducir apoptosis (Tangvarasittichai, 2015).

Existen varios genes involucrados en la patogénesis de la DMT2, los cuales están implicados en la señalización de la insulina, secreción de la insulina, resistencia a la

insulina, metabolismo de la glucosa y obesidad. El riesgo de desarrollar DMT2 por factores genéticos cambia desde las primeras migraciones humanas, implicando que existe una fuerte influencia ambiental que afectó las bases genéticas para que ciertas poblaciones se volvieran más propensas al desarrollo de la enfermedad (AlSaraj, 2015). Algunos de los genes involucrados en la DMT2 se han vinculado a varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), tal es el caso de SLC30A8 (codifica para un transportador de zinc requerido para el almacenamiento de insulina), KCNJ11 (codifica para canal de K⁺ dependiente de ATP), y GCKR (codifica para glucoquinasa). La mayoría de las variantes asociadas a DMT2 se localizan en intrones con algunas excepciones en exones. La disfunción de las células β también ha sido asociada a modificaciones epigenéticas y patrones de microRNA, aumentando la fracción de casos en los cuales la herencia es un factor patogénico relevante (DeFronzo, 2015).

3.2.1 Diagnóstico DMT2

El diagnóstico que se haga debe ser confiable, ya que, de lo contrario, éste puede representar consecuencias graves. Para lograr este objetivo, la o las pruebas que se realicen deben tener parámetros bien establecidos y estar estandarizadas para que puedan ser aplicadas todas a las poblaciones. Existen varias pruebas que permiten diagnosticar diabetes determinadas por distintos organismos de salud como la ADA, OMS, IDF, entre otros.

Las pruebas diagnósticas se basan principalmente en medir los niveles de glucosa plasmática (Tabla 1). Estas pruebas son: medición de glucosa plasmática en ayuno (FPG, por sus siglas en inglés); medición de la glucosa plasmática a las 2 horas durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (ingesta de 75g de glucosa anhidra disuelta en agua) (2-h PG – OGTT, por sus siglas en inglés); medición de glucosa plasmática al azar o glucosa plasmática casual (pacientes con los síntomas clásicos de hiperglucemia o en una crisis hiperglucémica); y la medición de hemoglobina glicada (HbA1C), recomendada para la diagnosis de diabetes desde 2010 (Kerner & Brückel, 2014; ADA, 2017). La FPG, 2-h PG después de OGTT, y HbA1C son pruebas igualmente apropiadas para el diagnóstico de DMT2, sin embargo éstas no necesariamente detectan diabetes en los mismos individuos, por lo que es necesario realizar más de una prueba (ADA, 2018).

La prueba HbA1C presenta algunas ventajas sobre aquellas basadas sólo en la medición de glucosa plasmática; por ejemplo: no se requiere ayuno, tiene una mayor estabilidad pre analítica, y menos perturbaciones durante situaciones de estrés o enfermedad (ADA, 2018).

Tabla 1. Criterios para la diagnosis de DMT2 (ADA, 2018).

Prueba	Criterios
HbA1c	≥ 6.5% (≥ 48mmol/mol)
Glucosa plasmática al azar	≥ 200 mg/dl (≥ 11.1 mmol/L)
FPG	≥ 126 mg/dl (≥ 7.0 mmol/dl)
2-h PG – OGTT	≥ 200 mg/dl (≥ 11.1 mmol/L)

3.2.2. Tratamientos DMT2

Existen diversas formas de tratar la DMT2 dependiendo del avance de la enfermedad y del paciente. Sin importar el tipo de diabetes, los pacientes deben mantener una dieta balanceada y realizar actividad física; sin embargo, algunas veces, es necesario implementar el uso de otro tipo de terapias para controlar los niveles de glucosa (Lorenzati et. al., 2010). En la tabla 2 se muestran los principales hipoglucemiantes orales usados para el tratamiento de la DMT2.

Tabla 2. Hipoglucemiantes orales empleados en el tratamiento de DMT2 (Cheng et al. 2005; Stumvoll et al. 2005; Aparoop, D. et. al., 2017).

Hipoglucemiante	Mecanismo de acción	Fármaco	Otras características
Inhibidores de α-glucosidasas	Retrasa la absorción intestinal de carbohidratos inhibiendo de manera competitiva las α -glucosidasas. Activa AMPK.	Acarbosa, miglitol.	Retrasa digestión. Flatulencias. Costo moderado.
Biguanidas	Aumenta la sensibilidad de la insulina en músculo esquelético e hígado. Disminuye la producción de glucosa hepática inhibiendo la gluconeogénesis.	Metformina.	Mejora perfil lipídico y cardiaco. Diarrea, dolor abdominal. Bajo costo. Se puede usar en combinación con otros fármacos (sulfonilureas, insulina).
Sulfonilureas	Aumenta secreción de insulina, cierre de los canales de K^+ (SUR1).	Gliclazida, glipizida, glibenclamida , glimepirida.	Baja durabilidad. Puede causar hipoglucemia. Ganancia de peso. Bajo costo.
Meglitinidas	Aumento agudo de secreción de insulina, cierre de canales de K^+ (SUR1) (Se une a un sitio diferente de las sulfonilureas).	Repaglinida , nateglinida.	Disminuye glucemia postprandial. Puede causar hipoglucemia. Se puede usar en combinación con metformina. Costo elevado.
Tiazolidinedionas (TDZ)	Aumenta la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo y músculo esquelético. Activa factor de transcripción PPAR- γ . Disminuye producción de glucosa hepática.	Rosiglitazona, pioglitazona.	Disminuye triglicéridos. Disminuye HbA1c 1-2%. Costo elevado.
Inhibidores de lipasa intestinal	Disminuye la absorción intestinal de lípidos.	Orlistat.	Disminuye la absorción de vitaminas liposolubles. Colestasis.
Incretinas	Regulan acción de insulina. Inhiben DPP4. Activan receptores GLP-1R. Estimula la secreción y biosíntesis de insulina. Inhibe apoptosis y promueve la proliferación de células- β .	Sitagliplina, vildagliptina, saxagliptina (inhibidores de DPP4). Liraglutida	Disminuye glucemia postprandial. Náuseas. Costo elevado.

Actualmente se encuentran disponibles varias opciones farmacológicas que no solamente se enfocan en tratar la disfunción de células β o la resistencia a la insulina. Se han reconocido otros factores contribuyentes, como la lipólisis acelerada en adipocitos, la

deficiencia de incretinas en el tracto gastrointestinal, la hiperglucagonemia o la reabsorción incrementada de glucosa en los riñones (Mazzola, 2012).

La elección del medicamento adecuado para una persona con diabetes debe estar basada en ciertas consideraciones, tales como la efectividad que tiene el fármaco para reducir los niveles de glucosa, seguridad del fármaco, que sean de uso fácil, y el costo. Los medicamentos pueden emplearse en monoterapia o en combinación dependiendo del paciente. Cuando los niveles de glucemia son muy elevados se recomiendan aquellos fármacos con acción más rápida en reducir los niveles de glucosa plasmática o usar algunos en combinación para tener una terapia más efectiva. De tal forma que, cuando se presentan niveles de glucemia no muy elevada es recomendable el uso de medicamentos con menor potencial hipoglucemiante o de acción más lenta (Mazzola, 2012).

3.2.2.1 Secretagogos de insulina: glibenclamida y repaglinida.

Los secretagogos de insulina han sido usados como tratamiento para la DMT2 desde la década de 1950. Funcionan estimulando la secreción de insulina en las células pancreáticas, y se dividen en dos tipos principales: sulfonilureas y meglitinidas. Los primeros poseen una vida media más larga, mejoran indirectamente la sensibilidad a la insulina y suprimen la producción de glucosa hepática durante la noche, sin embargo, conllevan a un riesgo de presentar hipoglucemia y ganancia de peso. Los segundos poseen una vida media más corta, pero su acción es más rápida y el riesgo de hipoglucemia es menor. Ambos pueden usarse en monoterapia o en combinación con otros fármacos como la metformina (Nathan et al., 2009; Lorenzati et. al., 2010).

La glibenclamida es una sulfonilurea de segunda generación, causa hipoglucemia al estimular la liberación de insulina en las células β pancreáticas (Aparoop et. al., 2017). Se une a la subunidad SUR1 (receptor a sulfonilurea) de los canales de K^+ sensibles a insulina en la membrana plasmática de las células β , causando que éstos se cierren a través de cambios conformacionales provocando una despolarización de membrana y la activación canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; la entrada de calcio provoca la contracción de los microtúbulos y la liberación de gránulos preformados de insulina que se encuentran adyacentes a la membrana plasmática (Cheng et al. 2005; Bösenberg, 2014; Pontarolo et. al., 2015) (Figura 8). SUR1 es un transportador dependiente de ATP (transportador ABC), y sirve como la subunidad regulatoria de canales iónicos. El canal sensible a ATP (K_{ATP}) es un complejo octamérico de cuatro subunidades Kir6.2 que

forman un poro y cuatro subunidades SUR1 regulatorias, ligando el metabolismo celular a la actividad eléctrica en las células β y otros tipos celulares (Aittoniemi et. al., 2008).

La repaglinida es una meglitinida derivada del ácido benzoico. Su mecanismo de acción es similar al de las sulfonilureas, sin embargo, la unión al SUR1 ocurre en un sitio diferente con una cinética diferente a la de las sulfonilureas. Lo anterior se refleja en una acción más rápida y una vida media más corta, lo que resulta en una breve estimulación de insulina a diferencia de la glibenclamida que tiene un efecto más prolongado y puede administrarse una vez al día (Cheng et al. 2005; Lorenzati et. al., 2010; Aparoop et. al., 2017).

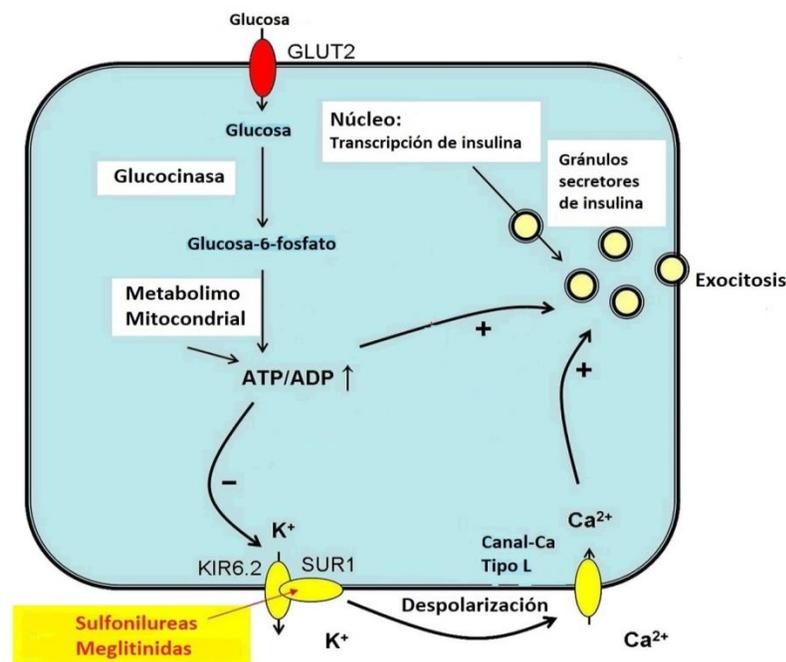


Figura 8. Mecanismo de acción de secretagogos de insulina (sulfonilureas y meglitinidas) comparado con la secreción estimulada por glucosa. Los fármacos secretagogos se unen a SUR1 causando cambios conformacionales que provocan el cierre del canal de K⁺ sensible a ATP. Lo anterior provoca la despolarización de la membrana plasmática y la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. La entrada de Ca²⁺ estimula la exocitosis de gránulos de insulina. (Tomada y modificada a partir de Becker et al. 2018).

La glibenclamida estimula la segunda fase de secreción de insulina (insulina preformada), y se requiere de una población abundante de células β con capacidad insulinosecretora para su función. La diferencia entre el tratamiento de repaglinida comparado con el de la glibenclamida, se observa en que, administrado el primero, ocurre una elevación temprana de la secreción de insulina (primera fase), reduciendo los niveles postprandiales de glucosa a la normalidad (Becker et al., 2018).

3.3. Modelo de hiperglucemia inducida STZ-NA

Para entender mejor la patogénesis y las complicaciones involucradas en la DMT2, así como para evaluar distintos agentes terapéuticos, es necesario el uso de modelos experimentales apropiados. Los modelos animales se pueden obtener de manera espontánea, a través de dieta, manipulación quirúrgica, con el uso de fármacos o con una combinación de técnicas (Tahara, 2008). Algunos de los anteriores son conocidos por tener ciertas características patológicas similares a las de la DMT2. Sin embargo, el hecho es que no existe ningún modelo animal que pueda reproducir el desarrollo y la patología completa de la DMT2 humana y sus complicaciones (Tahara, 2008; Radenkovic, 2016).

Uno de los modelos inducidos químicamente más utilizados en la actualidad es el modelo de hiperglucemia estreptozotocina-nicotinamida (STZ-NA) para la obtención de ratas con hiperglucemia crónica desarrollado por Massiello et al. (1998). El principal objetivo de dicho modelo es que exista una respuesta de las células β cuando se administre glucosa; así como cuando se administre algún secretagogo de insulina (glibenclamida o repaglinida) o algún agente con potencial efecto hipoglucemiante.

El modelo STZ-NA consiste en la administración de estreptozotocina (STZ) y nicotinamida (NA). La STZ causa daño a las células β pancreáticas, mientras que la NA tiene una acción de protección parcial contra la STZ permitiendo un modelo que emula la hiperglucemia presentada en la DMT2. Para tener el efecto protector de la NA, ésta se administra antes de la STZ. La hiperglucemia resultante puede ser moderada o alta dependiendo de la concentración de STZ y NA administradas, y la vía por la cual se administren dichas sustancias (Szkudelski, 2012).

La STZ (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa) es un antibiótico de origen fúngico sintetizado por *Streptomyces achromogenes*. Debido a su estructura similar a la glucosa, entra a la célula β de forma similar a ésta (Figura 9) (Radenkovic, 2016). La STZ es transportada a las células β vía GLUT2 y causa daños en el DNA incrementando la actividad de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP-1) al tratar de reparar el DNA. La sobreactivación de esta enzima resulta en el agotamiento de NAD^+ intracelular y ATP, lo que lleva a la necrosis de las células β . La actividad protectora de NA se da debido a la inhibición de la PARP-1, previniendo el agotamiento del NAD^+ y ATP. Además esta molécula sirve como precursor de NAD^+ (Figura 10) (Szkudelski, 2012).

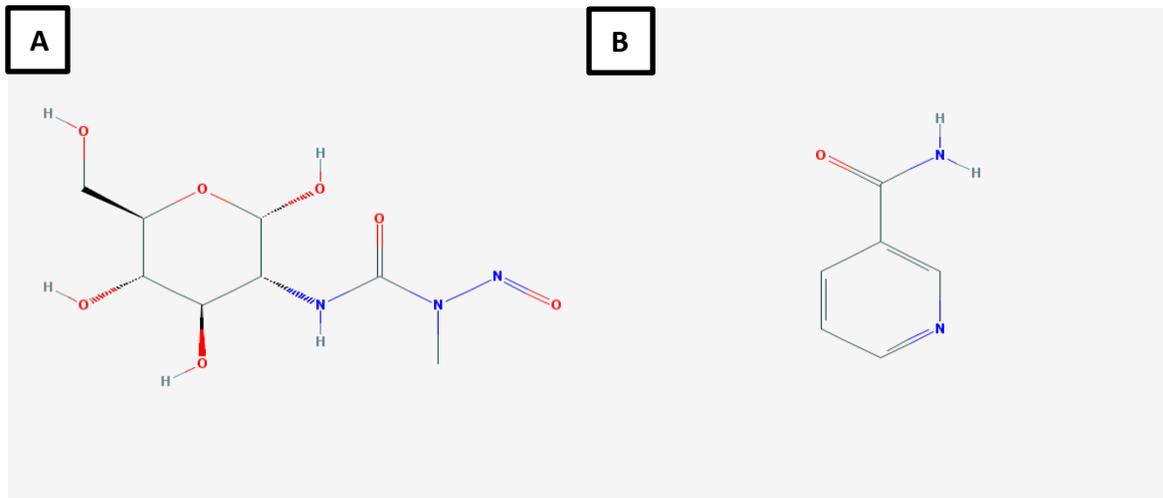


Figura 9. Estructuras de **A** estreptozotocina y **B** nicotinamida (Tomada y modificada a partir de Eleazu *et al.* 2013).

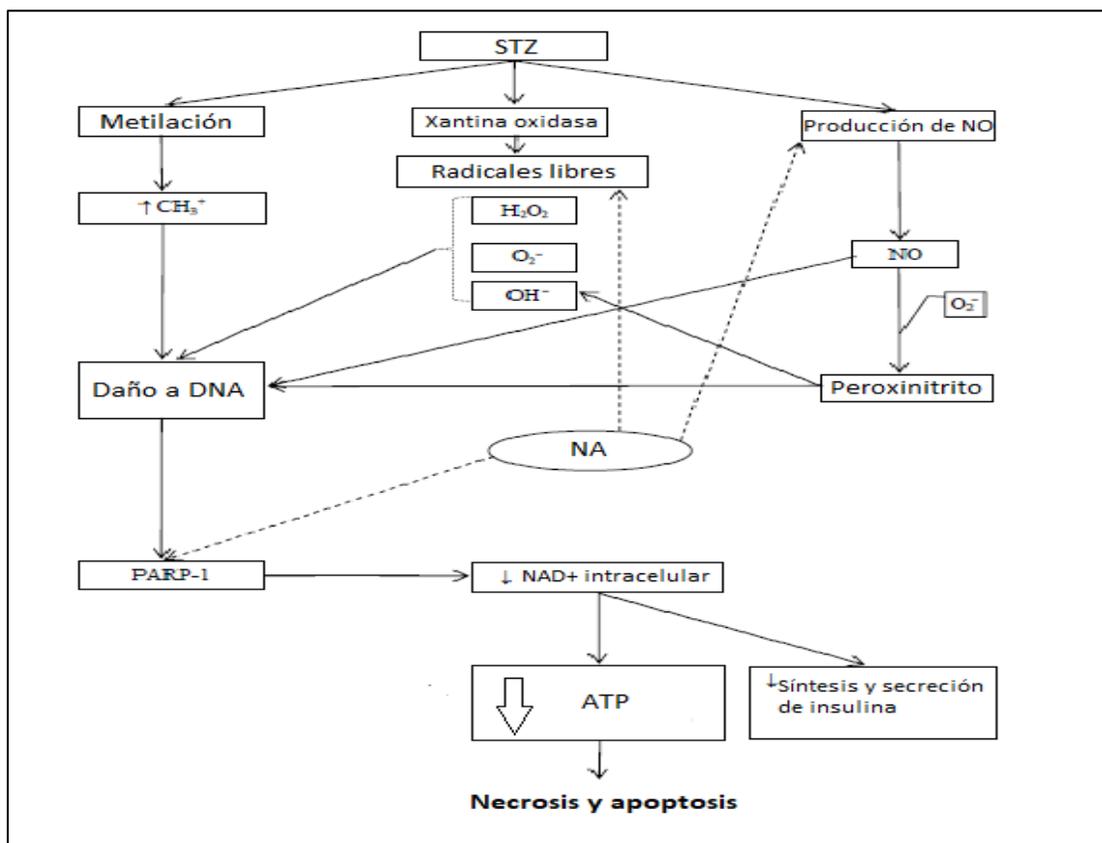


Figura 10. Mecanismo de acción del modelo STZ-NA. La STZ entra la célula a través de GLUT2, debido a su fracción glucosa (2-deoxi-D-glucosa). La fracción metilnitrosurea es responsable de la parte tóxica generando iones CH_3^+ , que provoca la metilación del DNA y su ruptura. Se activa PARP1 disminuyéndose los niveles de NAD^+ y ATP, lo que promueve la muerte celular por falta de energía. Además de la metilación de DNA, la STZ causa estrés oxidativo induciendo sintasas (xantina oxidasa) de NO (óxido nítrico) y aumentando la producción de NO. El NO se combina con superóxidos y forma peroxinitrito el cual se descompone en radicales libres. La NA es capaz de inhibir a PARP-1, además de evitar la formación de radicales libres y NO (Tomada y modificada a partir de Ghasemi *et al.*, 2013).

3.4. Fitoquímica

El objetivo principal de la fitoquímica es el estudio de los constituyentes químicos de las plantas; dicho estudio abarca su biosíntesis, metabolismo, distribución natural, función biológica, aislamiento, purificación y estructura química (Ortiz, 1995). La fitoquímica es una ciencia que abarca un área de estudio muy amplia, y las investigaciones en este campo suelen ser muy importantes para numerosas disciplinas, como la fisiología, bioquímica, quimiotaxonomía, biotecnología, farmacología y farmacognosia, entre otras. Una de las aplicaciones más importantes de la fitoquímica se da en el campo de la farmacognosia. La farmacognosia forma parte de las ciencias farmacéuticas y se concentra en el estudio de los productos naturales (PN) encontrados en los seres vivos, principalmente aquellos encontrados en plantas, que muestren actividad biológica y que puedan ser usados en terapia (Waksmundzka-Hajnos et. al., 2008).

El término PN se refiere a los compuestos derivados de plantas, animales, hongos, y bacterias, que incluyen los metabolitos primarios y secundarios. Los PN incluyen alcaloides, terpenoides, esteroides, amino ácidos, proteínas, glucósidos, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas, hormonas, reguladores de crecimiento, pigmentos, y más (Bhat et. al., 2005).

Los metabolitos secundarios tienen un rol ecológico muy importante en cómo los seres vivos interactúan con el medio y por lo tanto son de gran importancia para su sobrevivencia. Los anteriores pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Taiz & Zeiger, 2007).

Las plantas han sido usadas como medicina desde tiempos muy antiguos. La etnofarmacología en particular, encargada de la evaluación científica de las plantas (y otros organismos vivos) usadas en la medicina tradicional, se ha mostrado como una disciplina capaz de identificar compuestos químicos para el tratamiento de diversas enfermedades (Cotton, 1996). Las plantas son una fuente de moléculas con potencial terapéutico, de las cuales sólo un porcentaje muy pequeño de las aproximadas 250,000 especies han sido investigadas con respecto a su probable utilidad en la medicina (Raaman, 2006; Waksmundzka-Hajnos et. al., 2008). Varios PN producidos por plantas, hongos, animales y bacterias han sido aislados como farmacóforos biológicamente activos. Aproximadamente un tercio de los medicamentos más vendidos en el mundo son PN o derivados, y varios de ellos cuentan con estudios etnofarmacológicos previos, siendo

reconocidos ampliamente dentro de la industria farmacéutica por su diversidad estructural al igual que su amplio rango de actividades farmacológicas (Raaman, 2006).

Los fármacos que se obtienen de fuentes naturales provienen de una serie de individuos que viven bajo diferentes condiciones, por lo que éstos pueden presentar variaciones en su contenido; por lo tanto, los fármacos se deben obtener controlando las condiciones de producción, con la finalidad de obtener cierta homogeneidad. Las drogas crudas vegetales son productos que únicamente han pasado por los procesos de recolección y secado. Las formas en las que las drogas vegetales se presentan dependen del uso y los ingredientes activos que contengan, al igual que el factor económico. Éstas pueden presentarse como planta fresca, planta seca, productos acelulares (gomas, resinas, bálsamos, etc.), preparaciones galénicas (infusión, decocción, maceración, percolación, extracción continua), extractos procesados y compuestos puros (Ortiz, 1995).

3.4.1 Cromatografía en Capa Fina

Dentro de los métodos químicos para la examinación de plantas, el análisis cromatográfico tiene un papel muy importante, y ha sido introducido a todas las farmacopeas modernas. Lo anterior debido a que presenta numerosas ventajas como la especificidad y la posibilidad de ser usado como análisis cualitativo y cuantitativo, formando parte integral del análisis de plantas medicinales (Waksmundzka-Hajnos et. al., 2008).

Las técnicas cromatográficas se caracterizan por la separación de compuestos químicos de mezclas complejas, y depende de la distribución de las sustancias separadas entre dos fases del sistema; la fase móvil, que puede ser líquida o gaseosa, acarrea la muestra a través del sólido o líquido que forma la fase estacionaria. Los compuestos se separan debido a las diferencias en sus afinidades por la fase estacionaria y su solubilidad en la fase móvil. Los compuestos que se separan se adsorben y desadsorben en la fase estacionaria repetidas veces mientras el disolvente pasa por la fase estacionaria. Los compuestos se separan porque aquellos más polares son adsorbidos preferencialmente en la fase estacionaria, así, los compuestos polares permanecen por más tiempo que los menos polares o no polares que requieren de mayor cantidad de disolvente para ser acarreados a través de la fase estacionaria (Mohrig et. al., 2010).

Los métodos cromatográficos que se usan con más frecuencia para análisis fitoquímicos son: la cromatografía en papel, cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en

columna, la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). La CCF es la técnica más ampliamente usada para el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos orgánicos, así como para el aislamiento e identificación de compuestos de mezclas complejas (Mohrig et. al., 2010; Waksmundzka-Hajnos et. al., 2008).

En la CCF se emplean placas de vidrio, metal o plástico recubiertas de una capa fina de adsorbente que sirve de fase estacionaria, éste puede ser de gel de sílice (SiO_2), óxido de aluminio (Al_2O_3) o celulosa. Fuerzas intermoleculares causan que las moléculas orgánicas se unan a la fase estacionaria sólida, sólo fuerzas débiles de van de Waals unen los compuestos no polares al adsorbente pero las moléculas polares pueden unirse por interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno, de esta manera se puede decir que entre más polar sea un compuesto éste se unirá más fuertemente al gel de sílice y se trasladará de forma más lenta. La fase móvil es un compuesto líquido puro o una disolución de varios compuestos líquidos; la composición de la fase móvil depende de las polaridades de los compuestos en la mezcla que se desea separar (Sherma & Fried, 2003).

Para llevar a cabo la CCF, se aplica una cantidad pequeña de la mezcla (disuelta preferentemente en disolventes orgánicos no polares o de baja polaridad) en el adsorbente cerca de uno de los bordes de la placa. Posteriormente la placa se coloca en una cámara cerrada, con el borde inmerso donde se aplicó la muestra en la fase móvil. La fase móvil asciende por la fase estacionaria por capilaridad (Figura 11A). Los compuestos coloridos se pueden visualizar sin problemas en la placa, sin embargo, algunas veces es necesario observar bajo luz UV. Por otro lado, aquellos compuestos incoloros requieren de métodos indirectos como la aplicación de reveladores (adsorbentes que contienen indicadores fluorescentes), que raramente interfieren con los resultados cromatográficos permitiendo una visualización franca o bajo luz UV (Mohrig et. al., 2010). El parámetro básico usado para describir la migración de los compuestos a través de la fase estacionaria en la cromatografía en capa fina es el valor de factor de retención ($R_f = \text{distancia solvente}/\text{distancia muestra}$) (Figura 11B) (Sherma & Fried, 2003).

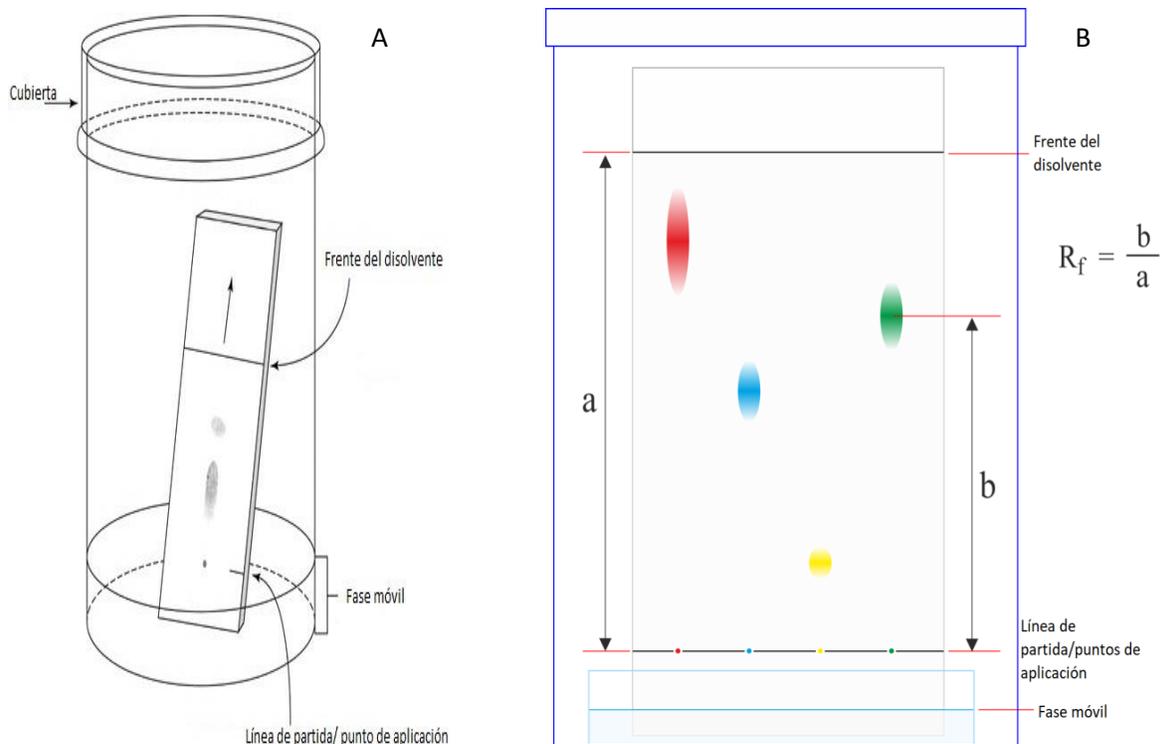


Figura 11. CCF. A. Desarrollo de CCF (Tomada y modificada a partir de <https://www.uam.es/gruposinv/lumila/personal/ebr/qot/leccion9/default.html>). B. Representación gráfica para obtener el R_f (Tomada y modificada a partir de: Generalic, Eni. "Paper chromatography." Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary. <https://glossary.periodni.com>).

3.5. Etnofarmacología

La etnofarmacología es un campo de estudio multidisciplinario que involucra la participación de la antropología, la etnobiología, la fitoquímica y la farmacología. Las observaciones y las descripciones de campo acerca del uso y los efectos de la medicina tradicional, identificación de las especies, los estudios fitoquímicos y farmacológicos están todas dentro del alcance de la etnofarmacología. Uno de los objetivos de esta disciplina es rescatar y documentar la herencia cultural, y la investigación y evaluación de los agentes empleados (Holmstedt, 1983). Andrade-Cetto y Heinrich (2011) definen la etnofarmacología como el estudio de productos naturales biológicamente activos usados tradicionalmente con el propósito de entender su acción terapéutica.

La etnofarmacología como campo específico de investigación tiene poco tiempo, y el término fue usado por primera vez en 1967 en un libro titulado "Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs" (Efron et al. 1970). La etnofarmacología ha servido como herramienta para el descubrimiento de nuevos compuestos sintetizados por distintos

organismos vivos que son utilizados en la medicina tradicional. En México existen alrededor de 62 grupos étnicos, los cuales cuentan con su propia cultura, lengua y conocimiento sobre el uso de plantas con fines medicinales (Juárez-Vázquez et. al., 2013). Es debido a la gran riqueza cultural y a la enorme diversidad biológica existente en México, que éste sea considerado un lugar ideal para llevar a cabo estudios de carácter etnofarmacológico (Andrade-Cetto, 2008).

La etnofarmacología se hizo posible debido a la habilidad científica de estudiar los efectos de las sustancias y extractos en sistemas modelo. Un gran número de estudios relacionados con plantas medicinales y otras plantas útiles, al igual que los compuestos activos, han usado múltiples conceptos y metodologías que en muchos casos han sido multidisciplinarios e interdisciplinarios. El enfoque etnofarmacológico se basa principalmente en estudios etnobotánicos y antropológicos bien documentados de plantas u otros organismos útiles, siendo una de sus principales metas mejorar las preparaciones obtenidas a partir de los organismos vivos para el uso de la gente local. No sólo se requiere de un entendimiento detallado del uso de las plantas medicinales, también se necesita apoyar el desarrollo autóctono para hacer mejor uso de estos productos (Heinrich & Gibbons, 2001).

En México se tiene reportado el uso tradicional de numerosas plantas para el tratamiento de la DMT2 (Hernández-Galicia et al., 2002; Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Subramoniam, 2016), donde los pacientes diabéticos acuden a médicos tradicionales, mercados o centros de venta de herbolaria para la obtención de plantas que puedan ayudar a su tratamiento, siendo que el uso tradicional de plantas para el tratamiento de esta enfermedad ha sido desarrollado hace décadas (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005). Sin embargo, la patología de la DMT2 no puede ser diagnosticada por médicos tradicionales, ya que son necesarias metodologías que involucran la medición de niveles de glucosa plasmática, por lo que los pacientes recurren a ellos generalmente una vez hecho el diagnóstico en un hospital o clínica de salud (Andrade-Cetto, 2015).

3.6. *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. Antecedentes etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos.

Una de las plantas reportadas dentro del uso de la medicina tradicional en México para el tratamiento de la diabetes es *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. (Figura 12) (Martínez, 1979; Ruiz-Méndez, 2000; Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Subramoniam, 2016).

Clasificación

Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta; Superdivisión: Spermatophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Asteridae; Orden: Asterales; Familia: Asteraceae; Género: *Calea*; Especie: *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl.

Sinónimos: *Alloispermum integrifolium* (DC.) H. Rob.

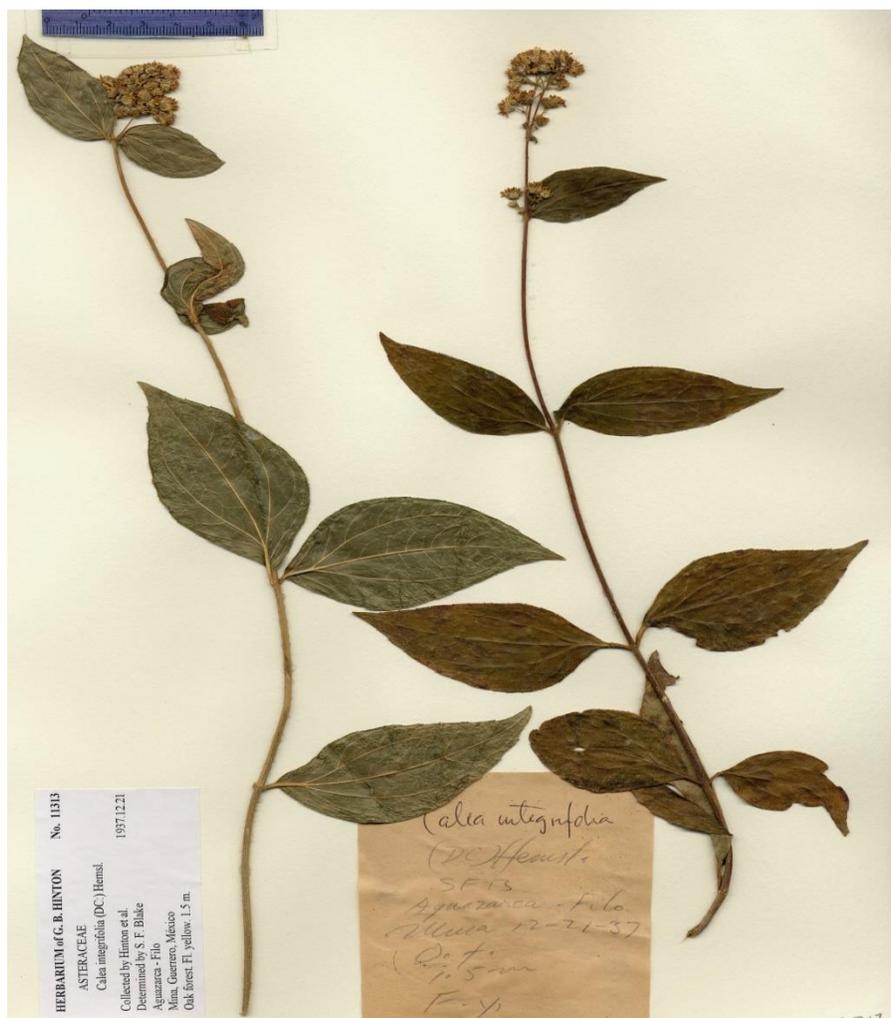


Figura 12. Ejemplar de herbario de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. (Imagen tomada de Tropicicos.org)

Descripción

Es un arbusto erecto o reclinado sobre otras plantas que mide hasta 3 m de alto. El tallo cuenta con tricomas largos y erguidos o sin ellos. Las hojas son opuestas, angostamente ovadas, de hasta 12 cm de largo y hasta 4 cm de ancho, puntiagudas, con margen acerrado (a veces entero), con la base redondeada o angostada, con tricomas erguidos de base hinchada que hacen rasposo el haz de la hoja (a veces con abundantes tricomas en el envés). Tiene peciolo muy cortos, de 1 mm o menos de largo. Presenta cabezuelas densamente agrupadas en inflorescencias ramificadas y de contorno redondeado, ubicadas en los ápices de las ramas y axilas de las hojas. En la periferia de las cabezuelas se encuentran flores liguladas (femeninas) y en el centro, flores del disco (hermafroditas). El fruto es seco e indehisciente con una sola semilla (aquenio) de color negrusco con pelillos (Hanan-Alipi & Mondragón-Pichardo, 2009).

Distribución



Figura 13. Mapa de la distribución de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl en México. (Registros descargados de CONABIO, 2018, imagen obtenida a partir del programa PoiViewer10).

Su área de distribución va de Nicaragua al norte de México. En México, se tiene reportada en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Morelos, Puebla, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, San Luis Potosí y Durango (Figura 13) (CONABIO, 2018; Hanan-Alipi & Mondragón-Pichardo, 2009).

Antecedentes etnobotánicos

El uso tradicional de esta especie para el tratamiento de la diabetes ha sido reportado en Michoacán, donde se le conoce como “amula de Monterrey”. La preparan en infusión usando todas las partes que se puedan conseguir de la planta (Ruiz-Méndez, 2000). En la comunidad de Tamala, Hidalgo, se le conoce como “jehuite amargoso”, y emplean la parte aérea de la planta (hojas, tallos, inflorescencias) para preparar una infusión que beben a lo largo del día (agua de tiempo). También se ha reportado con el nombre de “prodigiosa” (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005) o simplemente como “amula” (Martínez, 1979). Flores-Oceotl et al. (2018) reportan su uso tradicional para tratar afecciones del dengue.

De manera general, a varias especies del género *Calea* se les conoce dentro de la medicina tradicional como “prodigiosa”, incluyendo a *A. integrifolium* (*C. integrifolia*), sobre la cual Rzedowski & Rzedowski (2008) mencionan que también es conocida como “amula” o “chicalote de monte”.

Varias especies del género *Calea* son usadas dentro de la MT para tratar distintas afecciones además de la diabetes, como hipertensión, desórdenes gastrointestinales y respiratorios, úlceras gástricas e inflamación (Lima et al., 2017; Amaral et al., 2017). Por ejemplo, en México, la especie *C. zacatechichi* Schltld se emplea como colestático, catártico, antidiarreico, psicotrópico, antidiabético, para cólicos, fiebre, problemas respiratorios como asma y tos, y como tratamiento contra inflamaciones relacionadas con reumatismo o edema (Lima et al., 2017; Escandón-Rivera et al., 2017; Salaga et al., 2016).

Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos

Los estudios fitoquímicos sobre esta especie son muy escasos. En los primeros estudios realizados en Alemania encontraron compuestos como dehidrofalcarinona; dehidrofalcarinol; 2E, 9Z, 16E-heptadecatrieno-4, 6-dinol; 2E, 9Z, 16E-heptadecatrieno-4,6-dien-1-ol (Bohlman & Zdero, 1976). Por otro lado, también se tiene reportada la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Limuna et al., 2008).

Al recurrir a estudios realizados en otras especies del género, se encuentran antecedentes fitoquímicos y farmacológicos de 37 especies. Empleándose principalmente las partes aéreas en dichos estudios, se reporta que se han aislado alrededor de 257

compuestos de los cuales los más relevantes son: lactonas sesquiterpénicas, derivados de p-hidroxiacetofenona, compuestos fenólicos: cromenos, flavonoides, benzofuranos, y cromanos. Además, se han reportado diversos efectos biológicos para plantas del género *Calea*, incluyendo antiparasíticos (antiplasmodial, leishmanicidal, acaricidal, tripanocidal), anticonceptivo, vasodilatador, antimicrobiano, antidiarreico, antiinflamatorio, antidiabético y contra actividades citotóxicas (Lima et al., 2017; Amaral et al., 2017).

Entre los estudios realizados de especies dentro del género *Calea*, Escandón-Rivera et al., (2017) aislaron compuestos como herniarina, escoparona, 4',7-dimetilpigenina, ácido clorogénico, cromenos (6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno, dimetilencecalina, 6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno, 6-acetil-5-hidroxi-2-hidroximetil-2-metil-2H-cromeno) y lactonas sesquiterpénicas (Caleína A y C) de *C. ternifolia*. Se demostró que los cromenos, junto con las caleinas A y C, y el aceite esencial de la planta reducen la hiperglucemia postprandial en ratones normales e hiperglucémicos, principalmente a través de la inhibición de la actividad de α -glucosidasas.

En otro estudio realizado con *C. zacatechichi* (Salaga et al., 2016), se observó que el extracto acuoso presenta efectos antinociceptivos en ratones. Se encontraron compuestos como ácido clorogénico, acacetina, germacranólidos, rutina, calcalactona C y caleína A.

En un estudio que evaluó la actividad leishmanicidal y tripanocidal de los compuestos fenólicos de *C. uniflora* Less (Lima et al., 2015), se encontraron compuestos como etil cafeato, buteína, ácido cafeico, quercetina, entre otros. Mientras que Lima et al., 2015 reportó la presencia de cromenos y una lactona sesquiterpénica en el extracto de *C. pinnatifida*.

Por otra parte, se demostró que utilizando un extracto de varias especies del género *Calea* (incluyendo a *C. integrifolia*) se obtiene un efecto inhibitorio en la inducción de la diferenciación de adipocitos; efecto atribuido principalmente a derivados sesquiterpenoides (Limuna et al., 2008). En un estudio más reciente, se observó que el extracto acuoso de *C. integrifolia* ejerció un efecto hipoglucemiante en ratas hiperglucémicas STZ-NA durante una prueba de tolerancia a la sacarosa oral, sin embargo, ésta no inhibió el pico hiperglucémico y se descartó la inhibición de α -glucosidasas como posible mecanismo de acción (Ramos-Torres, 2018).

4. Justificación

El aumento en la prevalencia de pacientes con DM a nivel mundial, particularmente en países en vías de desarrollo como México, ha incentivado a la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos que puedan ayudar a controlar de una manera más adecuada esta enfermedad.

Las plantas representan una potencial fuente de compuestos con actividad biológica que podrían resultar de gran utilidad para el desarrollo de nuevos medicamentos o fitomedicamentos. En México, existe una tradición muy antigua respecto al uso de plantas medicinales, y a través de la etnofarmacología es posible tomar el conocimiento tradicional para desarrollar nuevas terapias que ayuden al tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la DM.

Reportes etnobotánicos sobre el uso tradicional de *C. integrifolia* para el tratamiento de la DM, brindan el sustento a la investigación farmacológica que pueda fundamentar y validar el uso de la planta y de sus compuestos para el tratamiento y desarrollo de nuevas terapias que ayuden a tratar los síntomas de la DM.

5. Objetivos

Objetivo general

- ✘ Probar el efecto hipoglucemiante de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl. en ratas STZ-NA hiperglucémicas.

Objetivos particulares

- ✘ Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *C. integrifolia* en ratas STZ-NA con hiperglucemia.
- ✘ Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *C. integrifolia* en ratas STZ-NA con hiperglucemia después de una carga de glucosa.
- ✘ Mediante CCF, los grupos funcionales principales en el extracto acuoso de *C. integrifolia*.

6. Hipótesis

- El extracto acuoso de la planta *Calea integrifolia* tendrá un efecto hipoglucemiante en ratas hiperglucémicas STZ-NA.
- El extracto acuoso de la planta *Calea integrifolia* inhibirá el pico hiperglucémico en ratas STZ-NA después de una carga de glucosa.

7. Metodología

7.1 Colecta

Andrade Cetto y Heinrich en el 2005 reportaron el uso tradicional de *C.integrifolia* para el control de la diabetes en comunidades mexicanas. Posteriormente, llevando a cabo entrevistas semiestructuradas por el grupo del laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, se encontró que los pobladores de la localidad de Tamala en el Municipio de Tepehuacán de Guerrero en el estado de Hidalgo, hacen uso de la planta *C. integrifolia* o “jehuite amargoso” (por el nombre que le dan los locales) para el control de la diabetes. El modo de empleo es realizar infusiones con 20g de la parte aérea de la planta y tomarla a lo largo del día como “agua de tiempo”.

La planta fue colectada a orillas de la carretera Hidalgo Otongo – Santa Ana de Allende cerca de la comunidad de Tamala, con ayuda de un guía local. Las coordenadas del sitio de colecta son las siguientes (noviembre, 2016):

- Latitud: 21° 0' 34" N
- Longitud: 98° 47' 57" O

7.2 Preparación del extracto acuoso de *Calea integrifolia* (DC.) Hemsl.

El material vegetal colectado se secó y molió empleando la parte aérea de la planta y eliminando los tallos más grandes. Se pesaron 20 g (con base en la información etnobotánica) del material y se colocaron en 500 ml de agua destilada en ebullición; se mantuvo en agitación por 15 minutos y se dejó reposar otros 5 minutos. Posteriormente, se filtró utilizando papel filtro y tierra de diatomeas en un embudo Büchner conectado a un matraz Kitasato y a una bomba de vacío. El material filtrado se ultracongeló a -40°C en un RevcoTM. Finalmente se eliminó el agua en una liofilizadora LABCONCO FreeZone 2.5^R, obteniendo el extracto seco.

La dosis de extracto que fue administrada a los animales de experimentación se calculó con base en el uso tradicional, donde 20 g de material vegetal es el peso equivalente de una persona con un peso de 70 kg que consume de planta. En este caso, se emplea el peso final del extracto seco obtenido de los 20 g usados inicialmente para elaborar el extracto, utilizando la siguiente ecuación para calcular la dosis requerida para un kg de peso:

$$\text{Dosis} = \frac{\text{Peso final del extracto seco (g)}}{70 \text{ kg}}$$

Cálculo de DER (Drug-Extract Ratio)

El DER indica la relación de la masa de la materia inicial o sustancia herbal con la masa del extracto resultante o preparación inicial. Este cociente indica cuántas partes de la preparación herbal se necesitan para obtener una parte de la sustancia herbal. El DER es influenciado por el solvente, el equipo utilizado durante la extracción, y la sustancia herbal.

$$\text{DER} = \frac{\text{Sustancia herbal (g)}}{\text{Preparación herbal (g)}} = x:1$$

7.3. Animales experimentales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de entre 2 y 3 meses de edad con un peso aproximado de 250 g (hembras y machos). Se mantuvieron con fotoperiodos de 12h luz / 12h oscuridad con agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001) *ad libitum*, y bajo condiciones estándar de temperatura (20–25°C) y humedad (50-55%). Los animales de experimentación fueron proporcionados y mantenidos por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM.

7.4 Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA

Empleando el modelo propuesto por Masiello en 1998 con algunas modificaciones, la hiperglucemia se indujo a ratas con un ayuno de 12 horas. Se preparó una solución de STZ de 65 mg/kg disuelta en 1 ml de buffer de acetatos (0.9% de acetato de sodio en 105 mM de ácido acético, pH 4.5) por kg de peso un día antes de la inducción y se refrigeró a una temperatura de 4°C. La NA se preparó a una dosis de 150 mg/kg disuelta en 2 ml de solución fisiológica (0.9% cloruro de sodio) por kg de peso, el mismo día de la inducción.

Primero se inyectó la NA vía intraperitoneal y 15 minutos después se inyectó STZ vía intravenosa. Transcurrida una semana de la inducción, se eligieron aquellos animales que presentaran una glucemia de alrededor de 200 mg/dl.

7.5. Administración de tratamientos

Se utilizaron dos estrategias experimentales que involucraron la medición del comportamiento de la glucosa plasmática al administrar el extracto en presencia o ausencia de una carga de glucosa (n=6) (Tablas 3 y 4). Cada tratamiento se administró después de medir la glucosa sanguínea basal en el tiempo (T0) y posteriormente se realizaron mediciones en los tiempos 30, 60, 90 y 120 minutos utilizando glucómetros Accutrend® Plus de Roche (por duplicado). Las mediciones se realizaron tomando sangre de la vena caudal de la rata (cortando una pequeña parte de la punta de la cola). Todos los tratamientos se administraron vía oral utilizando una cánula.

Tabla 3. Tratamientos de grupos sin carga de glucosa.

Grupo	Tratamiento
Normoglucémico (N)	Solución fisiológica (NaCl 0.9%)
Hiperglucémico (H)	Solución fisiológica (NaCl 0.9%)
Hiperglucémico + glibenclamida (HG)	Glibenclamida 5 mg/kg
Hiperglucémico + extracto (HE)	Extracto <i>C. integrifolia</i> 41 mg/kg

Tabla 4. Tratamientos de grupos con carga de glucosa.

Grupo	Tratamiento
Normoglucémico + glucosa (Ng)	Glucosa 2 g/kg
Hiperglucémico + glucosa (Hg)	Glucosa 2 g/kg
Hiperglucémico + repaglinidina + glucosa (HRG)	Repaglinidina 1 mg/kg + glucosa 2 g/kg
Hiperglucémico + extracto + glucosa (HEG)	Extracto <i>C. integrifolia</i> 41 mg/kg + glucosa 2 g/kg

Los medicamentos usados como control positivo fueron glibenclamida (Euglucon, Bayer) y repaglinidina (PRANDIN, Sanfer); éste último se recomienda junto a la ingesta de alimento debido a su mecanismo de acción, y es por eso que se administró 5 minutos antes de la carga de glucosa. Se empleó glucosa anhidra (Sigma) para todos los tratamientos con carga de glucosa.

7.6. Fitoquímica – Cromatografía en capa fina

Para determinar qué tipo de compuestos puede presentar la planta (flavonoides, alcaloides, terpenos, glucósidos), y así, tener una idea de cuáles pueden ser los responsables de su efecto hipoglucemiante, se realizaron algunos ensayos preliminares convencionales utilizando el método de CCF (Tabla 5).

Se pesaron 10 mg de extracto acuoso seco, y con la ayuda de un sonicador se disolvieron en una solución de 1ml de agua-metanol-acetonitrilo (30:35:35). Se aplicó 15 µl a distintas placas de sílica gel que fueron utilizadas para determinar la presencia de: flavonoides aglicona, flavonoides glucosilados, alcaloides, terpenos y una para glucósidos. A cada placa también se le aplicó 2 µl de muestras de compuestos conocidos que sirvieron como controles. Posteriormente, se aplicó un revelador químico para cada tipo de grupo funcional utilizando un atomizador conectado con una manguera y bomba de vacío, dentro de una campana de extracción.

Tabla 5. Fases móviles, controles y reveladores usados en cada placa de CCF.

Placa	Flavonoides glucosilados	Flavonoides agliconas	Alcaloides	Terpenos	Glucósidos
Fase móvil	Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua (10:1.1:1.1:2.6)	Diclorometano, metanol (9:1)	Diclorometano, metanol, hidróxido de amonio (9:0.9:0.1)	Hexano, acetato de etilo (6:4)	Butanol, isopropanol, ácido acético, agua (4.8:1.7:1.7:1.8)
Control	Ácido clorogénico, rutina	Quercetina, ácido cafeico	Colchicina, quinina	Timol	Glucosa, sacarosa
Revelador	Ácido difenilbourínico	Ácido difenilbourínico	Dragendorff	Vainillina + calor	Sulfato cérico

Las placas de CCF se analizaron con el software CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evaluation Software - Versión 1.02.00.

7.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de t de student empleando un nivel de significancia de $p < 0.05$. La estadística y las gráficas fueron realizadas con ayuda del programa Microsoft Excel.

8. Resultados

8.1. Cálculo de Dosis y DER

Se obtuvieron 2.87 g (preparación herbal) del extracto acuoso seco de la parte aérea de *C. integrifolia* a partir de los 20 g iniciales (sustancia herbal), requiriéndose 7 partes de la preparación herbal para obtener 1 parte de la sustancia herbal. La dosis calculada y empleada fue de 41 mg/kg.

$$\text{Dosis} = \frac{2.87 \text{ g}}{70 \text{ g}} = 0.041 \text{ g/kg}$$

$$\text{DER} = \frac{20 \text{ g}}{2.87 \text{ g}} = 7:1$$

8.2. Estudio farmacológico

Los grupos sin carga de glucosa (Tabla 6) presentaron diferencias significativas entre los grupos N (Normoglucémico) y H (Hiperglucémico) en todos los tiempos. El grupo H, con respecto al grupo HG (Hiperglucémico + glibenclamida 5mg/kg), fue estadísticamente significativo a partir del T30, mostrando que el modelo STZ-NA respondió al secretagogo glibenclamida; de igual manera, al comparar el grupo H con el grupo HE (Hiperglucémico + extracto 41mg/kg) se observaron diferencias significativas a partir del T30. Por otro lado, comparando el grupo HE contra el grupo HG, se observó que sólo existió diferencia significativa en el T90, mostrando un comportamiento similar (Gráfico 1).

Tiempo/ Grupo	0	30	60	90	120
N	120 +/- 3	125 +/- 3	125 +/- 3	128 +/- 4	121 +/- 2
H	188 +/- 2 a	204 +/- 8 a	201 +/- 9 a	192 +/- 9 a	183 +/- 12 a
HG	182 +/- 4 a	158 +/- 6 *ab	134 +/- 5 *b	118 +/- 4 *b	111 +/- 4 *b
HE	182 +/- 6 a	151 +/- 6 *ab	141 +/- 6 *ab	135 +/- 4 *bc	123 +/- 8 *b

Tabla 6. Promedios de glucosa plasmática (mg/dl) presentados con EEM de grupos sin carga de glucosa. Son presentadas las diferencias respecto a T0 de su grupo (*), diferencia con respecto a grupo N (a), diferencia respecto a grupo H (b), diferencia respecto a grupo HG (c).

En el grupo N se observó que los niveles de glucosa plasmática se mantuvieron a lo largo de la prueba, mostrando un comportamiento lineal. El grupo control H también mostró un comportamiento lineal durante los 120 minutos que duró la prueba (Gráfico 1), lo que demuestra que el modelo STZ-NA es adecuado para este experimento al mantenerse la hiperglucemia en los animales experimentales inducidos. Cuando se administró

glibenclamida en el grupo HG, se pudo observar la acción del fármaco desde el T30, llevando los niveles de glucosa plasmática a valores normoglucémicos.

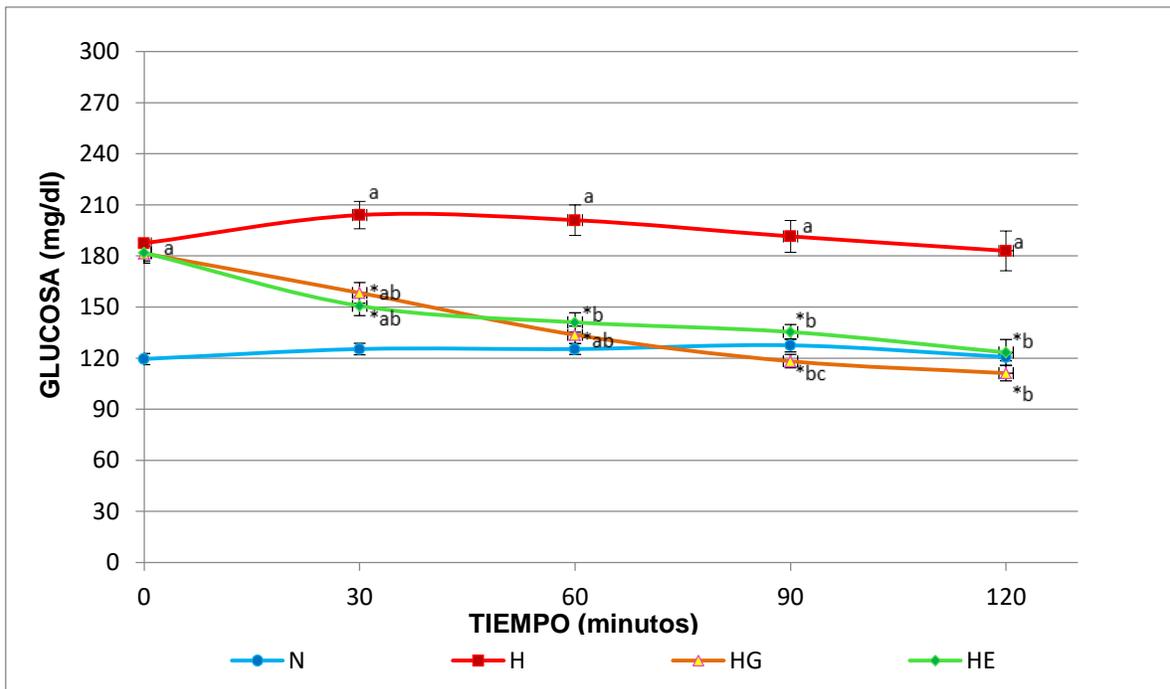


Gráfico 1. Curvas de grupos sin carga de glucosa presentados con EEM. Se presentan las diferencias respecto a T0 de su grupo (*), con respecto a grupo N (a), respecto a grupo H (b), respecto a grupo HG (c).

En cuanto a los resultados de los grupos con carga de glucosa (Tabla 7), se pudo observar que existieron diferencias significativas entre los grupos Ng (Normoglucémico + carga de glucosa 2g/kg) y Hg (Hiperglucémico + carga de glucosa 2g/kg) en todos los tiempos. Entre los grupos Hg y HRg (Hiperglucémico + Repaglinida 1mg/kg y glucosa 2g/kg) se observaron diferencias significativas a partir del T30. Comparando los grupos Hg y HEg (Hiperglucémico + Extracto 41 mg/kg y glucosa 2g/kg) se pudo notar que no existió diferencia significativa en ninguno de los tiempos, y entre los grupos HRg y HEg existió diferencia significativa desde el T30.

Al administrar glucosa en el grupo control Ng, se observó un aumento significativo en la glucosa plasmática desde el T30 y regresó a niveles basales en el T120. Caso contrario observado en el grupo hiperglucémico (Hg), donde los niveles de glucosa plasmática no se reestablecieron al final de la prueba (Gráfico 2), demostrando que los animales experimentales inducidos con el modelo STZ-NA no son capaces de regular adecuadamente sus niveles de glucosa frente a una carga de glucosa debido a la falta de insulina.

Tiempo/ Grupo	0	30	60	90	120
Ng	121 +/- 2	163 +/- 5 *	167 +/- 5 *	155 +/- 5 *	134 +/- 6
Hg	185 +/- 4 d	278 +/- 11 *d	277 +/- 12 *d	271 +/- 19 *d	223 +/- 11 *d
HRg	178 +/- 6 d	221 +/- 10 *de	174 +/- 9 e	142 +/- 6 *e	128 +/- 4 *e
HEg	180 +/- 6	269 +/- 22 *f	293 +/- 28 *f	256 +/- 22 *f	220 +/- 13 *f

Tabla 7. Promedios de glucosa plasmática (mg/dl) presentados con EEM de grupos con carga de glucosa. Se muestran la diferencia respecto a T0 de su grupo (*), diferencia con respecto a grupo Ng (d), diferencia respecto a grupo Hg (e), diferencia respecto a grupo HRg (f).

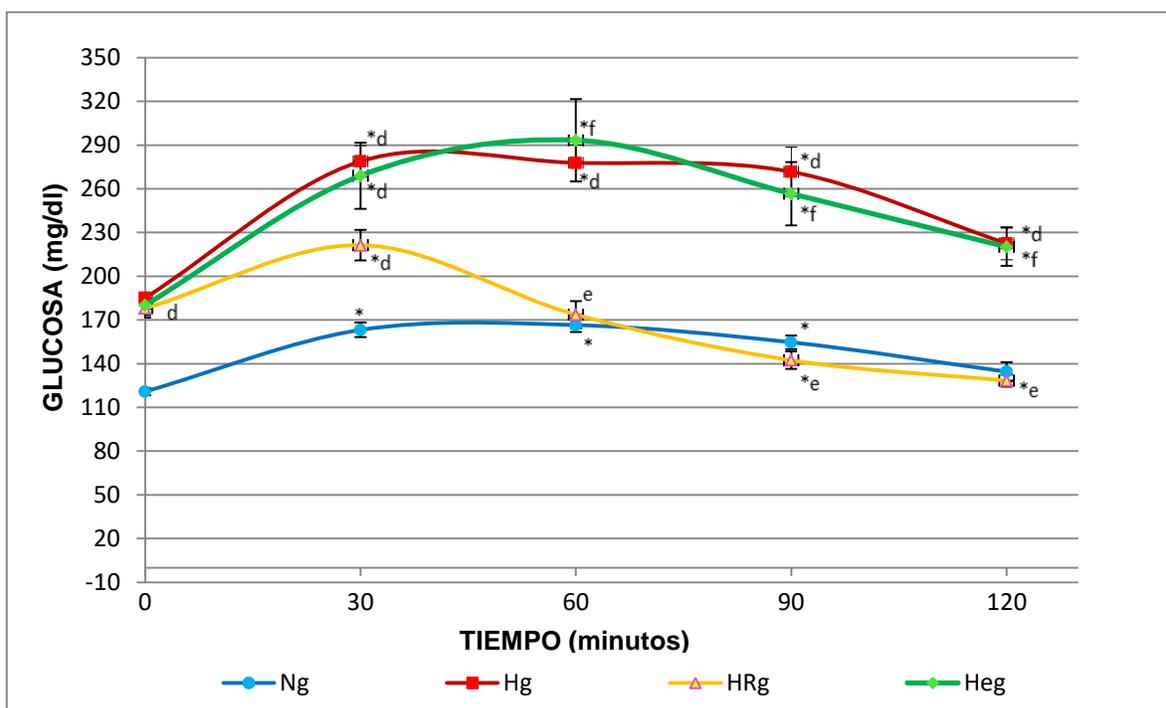


Gráfico 2. Curvas de grupos con carga de glucosa presentados con EEM. Se presentan las diferencias respecto a tiempo cero de su grupo (*), con respecto a grupo Ng (d), respecto a grupo Hg (e), respecto a grupo HRg (f).

En el grupo HRg se apreció que la repaglinida no inhibió el pico hiperglucémico (T30) después de una carga de glucosa, pero si se disminuyó de manera significativa si se compara con el grupo Hg (~60 puntos de diferencia), y al final de la prueba llegó a niveles normoglucémicos. El grupo HEg se comportó de manera similar al grupo Hg (Gráfico 2), por lo que el extracto no causó efecto después de una carga de glucosa.

8.3 CCF

De las cinco pruebas realizadas en CCF, sólo en dos de ellas se obtuvieron resultados positivos: en la placa de flavonoides glucosilados y en la de glucósidos (Tabla 8). En la primera se detectó la presencia de ácido clorogénico, de rutina, y de otros tres compuestos no identificados (Imagen 1); mientras que en la de glucósidos se detectó sacarosa, glucosa, y de otros cuatro compuestos no identificados (Imagen 2). En el resto de las placas, terpenos, alcaloides y flavonoides agliconas, se obtuvieron resultados negativos (Imágenes 3, 4 y 5 respectivamente).

Placas	Flavonoides agliconas	Flavonoides glucosilados	Glucósidos	Terpenos	Alcaloides
Extracto acuoso <i>C. integrifolia</i>	-	2 (3 no identificados)	2 (4 no identificados)	-	-

Tabla 8. Placas y número de compuestos detectados en CCF para el extracto acuoso de *C. integrifolia*.

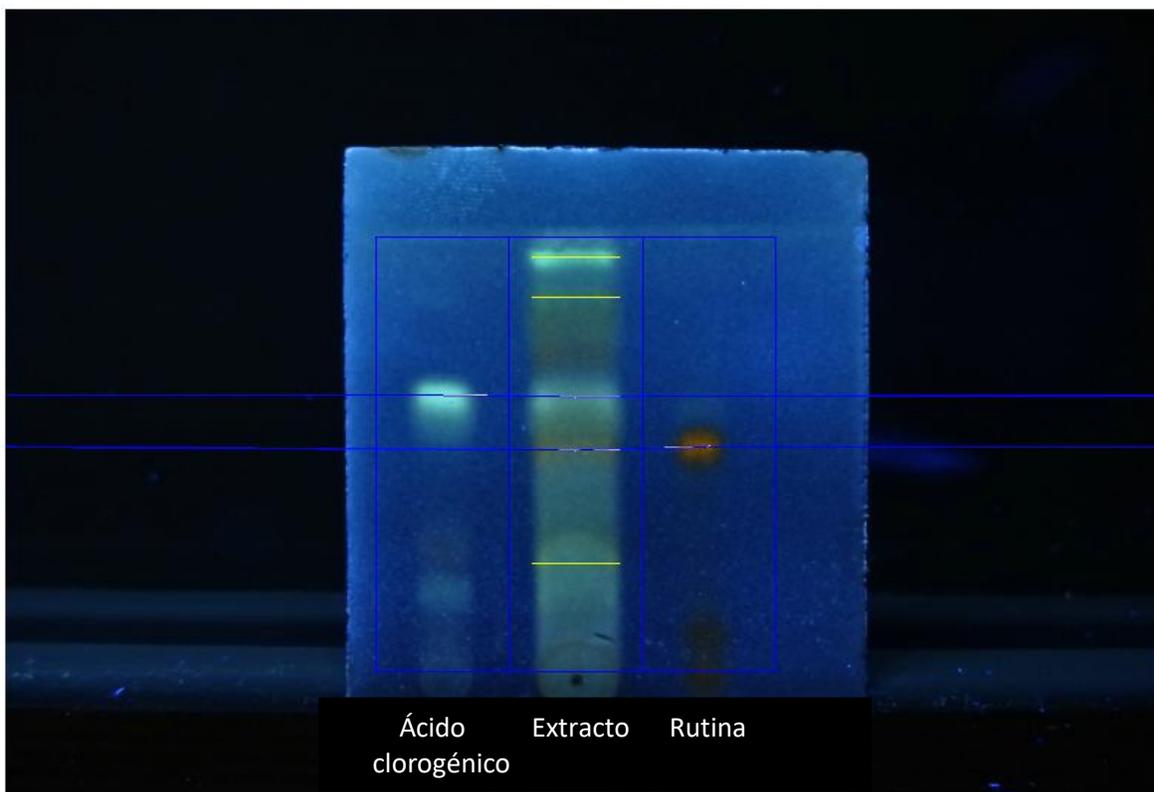


Imagen 1. CCF de flavonoides glucosilados. Las dos líneas horizontales azules indican que los compuestos ácido clorogénico y rutina se encuentran presentes en el extracto acuoso de *C. integrifolia*. Las líneas horizontales amarillas indican otros compuestos no identificados en el extracto acuoso de *C. integrifolia*. Imagen analizada con CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evaluation Software - Versión 1.02.00.

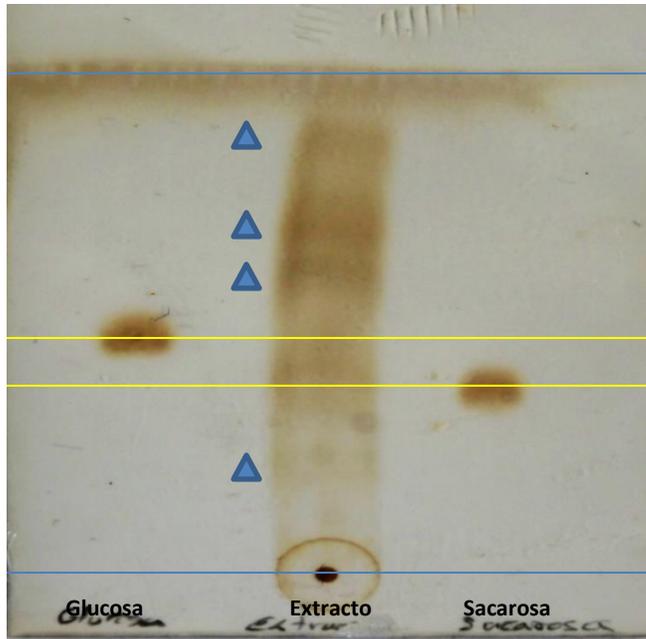


Imagen 2. CCF de glucósidos. Se nota la presencia de sacarosa y muy ligeramente de glucosa marcado por las líneas amarillas. Los triángulos azules muestran la presencia de otros compuestos no identificados.

En el gráfico 3 se muestra un cromatograma donde se comparan los tres carriles (ácido clorogénico-extracto-rutina) de la placa de flavonoides glucosilados, y se señalan los picos que coinciden. En la figura 14 se presentan tres tablas, en las cuales se puede observar que los valores de Rf de los picos 2 y 3 del extracto son similares a los de los controles, inclusive la parte final del pico 3 del extracto presenta el mismo Rf que el control. Lo anterior, confirma la presencia de ácido clorogénico y rutina en el extracto acuoso de *C. integrifolia*.

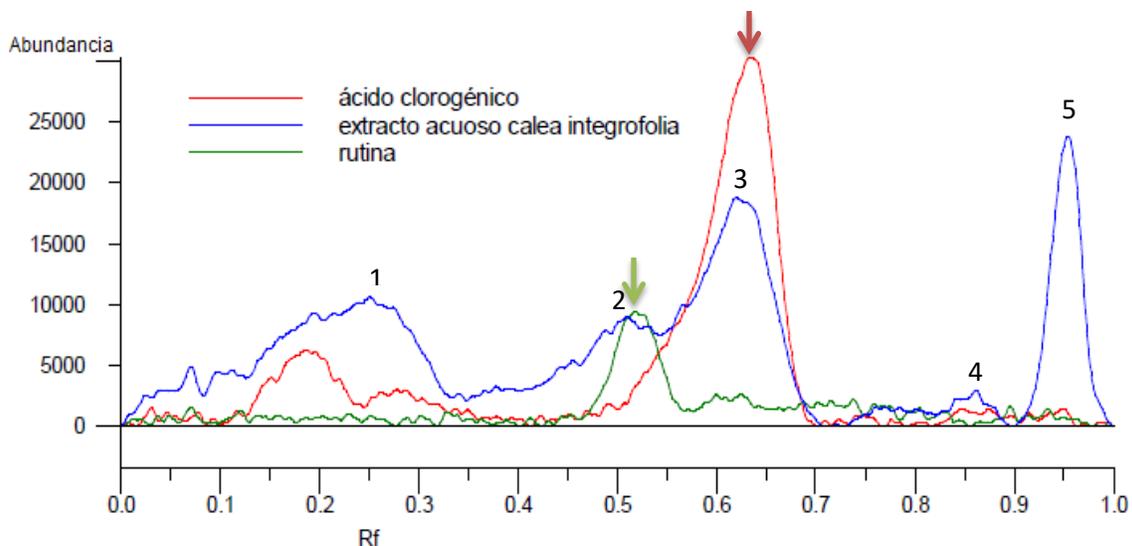
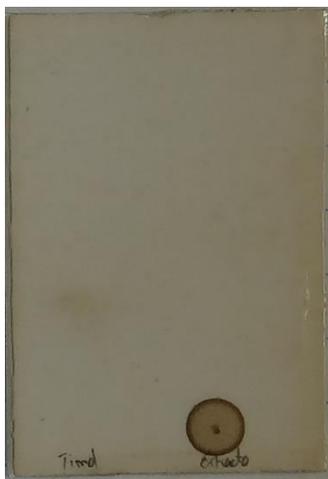


Gráfico 3. Cromatograma de la paca de flavonoides glucosilados. Comparación de los 2 compuestos control y el extracto. La flecha verde indica la rutina y la roja el ácido clorogénico. Picos 1, 2, 3, 4, 5 del carril del extracto. Realizado con CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evaluation Software - Versión 1.02.00.

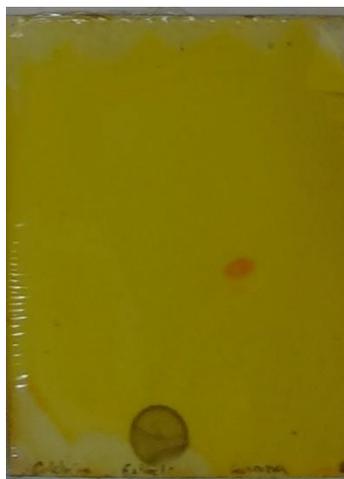
Carril	Picos	Rf máximo	Compuesto
1. Control-ácido clorogénico	1	0.635	Ácido clorogénico
2. Extracto	1	0.250	Rutina Ácido clorogénico
	2	0.509	
	3	0.632	
	4	0.861	
	5	0.954	
3. Control-rutina	1	0.517	Rutina

Tabla 9. Se presenta el Rf de cada pico de cada carril de la placa de flavonoides glucosilados. Datos obtenidos con el software CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evaluation Software - Versión 1.02.00.

A continuación se muestran imágenes de las tres placas restantes (terpenos, alcaloides y flavonoides agliconas), de las cuales no se obtuvieron resultados positivos:



Timol Extracto
Imagen 3. CCF terpenos.



Colchicina Extracto Quinina
Imagen 4. CCF Alcaloides.



Quercetina Ác. Caféico Extracto
Imagen 5. CCF Flavonoides agliconas.

9. Discusión

Como se mencionó previamente, existieron diferencias significativas en todos los tiempos entre los grupos N y H (Tabla 6, gráfico 1), debido al efecto citotóxico de la STZ en las células β pancreáticas, lo que demuestra la efectividad del modelo de causar hiperglucemia. Si se compara el grupo H con el grupo HG se puede observar claramente el efecto hipoglucemiante de la glibenclamida (Gráfico 1). La glibenclamida ejerce su efecto estimulando la secreción de insulina en las células β , por lo tanto, las ratas inducidas con hiperglucemia moderada todavía presentan una población importante de células β con capacidad insulinosecretora, debido a la acción protectora de la NA. Lo anterior demuestra la funcionalidad del modelo STZ-NA (Masiello, 1998) para inducir distintos grados de hiperglucemia dependiendo de las concentraciones de STZ y de NA, y que estos animales son útiles para el estudio de la DMT2.

Al igual que la glibenclamida, la repaglinida reduce los niveles de glucosa plasmática al estimular la secreción de insulina, pero ésta difiere en el sitio de unión al receptor, estructura, duración y modo de excreción; siendo más efectiva al reducir los niveles de glucosa postprandiales. En la tabla 7 y gráfico 2 se puede observar que la repaglinida no inhibe el pico hiperglucémico después de la carga de glucosa, aunque éste es significativamente menor comparado con el grupo Hg (~60 de diferencia).

Cuando se compara el grupo HE con el grupo H se aprecia que hay una diferencia significativa a partir del tiempo 30 hasta el 120, y si se compara con el grupo N se observa que en el tiempo 90 y 120 deja de existir diferencia significativa entre ambos (Tabla 6, gráfico 1). Lo anterior demuestra el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso de *C. integrifolia* en ratas hiperglucémicas STZ-NA. Aún más, al comparar el grupo HE con el grupo HG se puede observar que solamente hay diferencia significativa en el tiempo 90 (donde la diferencia es de ~17 puntos), y en el tiempo 120 ésta deja de existir (Tabla 6). También, el efecto del extracto acuoso de *C. integrifolia* es comparable con el de un fármaco probado como la glibenclamida (Gráfico 1). Sin embargo, esto no demuestra que el extracto acuoso de *C. integrifolia* actúe como secretagogo de insulina. Una de las razones para creer lo anterior se observa en la tabla 7 y gráfico 2, donde al comparar el tiempo 0 y 30 del grupo HEg, se encontró que existe diferencia significativa, y entre el grupo Hg y el grupo HEg no existe diferencia significativa en ninguno de los tiempos,

demostrando que el extracto acuoso de *C. integrifolia* no es capaz de inhibir ni reducir el pico hiperglucémico después de una carga de glucosa.

El grupo que presentó mayores intervalos de error (variación intragrupal) fue el grupo HEg, seguido del grupo Hg. Esto se puede ver asociado a la variación biológica intrínseca que presentan los organismos vivos, al mismo tiempo se puede comparar con la variabilidad que se observa en pacientes con DMT2.

Por otro lado, se lograron identificar dos compuestos fenólicos con conocida capacidad hipoglucemiante; ácido clorogénico y rutina (Tabla 8); (Imagen 1). Estos dos compuestos pueden ayudar a esclarecer el mecanismo de acción de la planta. El ácido clorogénico ejerce su acción hipoglucemiante, principalmente, inhibiendo la actividad de la glucosa-6-fosfatasa (G6-Pasa), enzima clave para la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Además, mejora la sensibilidad a la insulina y promueve la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, mejorando la entrada de glucosa a músculo esquelético y tejido adiposo, dada por la activación de AMPK, que actúa como sensor y regulador del balance energético de las células (Meng et al., 2013).

Los mecanismos de acción de la rutina son: la disminución de la absorción de carbohidratos en el intestino delgado, la inhibición de la gluconeogénesis, mejora la captación de glucosa periférica, y es capaz de estimular la secreción de insulina. Se ha observado que la rutina es capaz de inhibir α glucosidasas y α amilasas, inhibir la expresión transcripcional de G6-Pasa y de PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxicinasa), y estimular la síntesis y translocación de GLUT4 (Ghorboni, 2017).

En la imagen 1, correspondiente a la placa de flavonoides glucosilados, se observa la presencia de tres bandas más, las cuales probablemente pueden ser fenilpropanoides, y también estar implicados en el efecto hipoglucemiante de la planta.

Un tipo de metabolito que se había reportado en otros estudios que incluían a *C. integrifolia* (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Limuna et al., 2008), son las lactonas sesquiterpénicas, que fueron reportadas igualmente en otras especies del género (Limuna et al., 2008; Lima et al., 2015; Salaga et al., 2016; Lima et al., 2017; Amaral et al., 2017; Escandón-Rivera et al., 2017); sin embargo, no se logró detectar la presencia de terpenos en la placa de CCF realizada (Tabla 8), por lo que se propone realizar una extracción específica de terpenos para que sea posible separar e identificar algunos.

En otro estudio elaborado en el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias de la UNAM (Ramos-Torres, 2018), en el cual se empleó el mismo extracto, se observó que la planta ejerció efecto hipoglucemiante durante una prueba de tolerancia a la sacarosa oral en ratas STZ-NA, el cual se observó en el tiempo 90 (último tiempo de la prueba de 90 minutos) reestableciéndose los niveles basales de glucosa plasmática. Sin embargo, se descartó la inhibición de α glucosidasas como posible mecanismo de acción debido a la ausencia del efecto inhibitorio sobre la actividad de las enzimas α glucosidasas en ensayos *in vitro*. Tampoco se observó que inhibiera el pico hiperglucémico después de la carga de sacarosa.

Aunque a los flavonoides glucosilados como la rutina y el ácido clorogénico se les haya asociado con actividad inhibitoria de α glucosidasas, al igual que las lactonas sesquiterpénicas (Caleina A y C) reportadas en *C. ternifolia* (Escandón-Rivera et al., 2017) (las cuales no se descarta que podrían estar presentes en *C. integrifolia*, y que también se reportaron en *C. zacatechichi*, Salaga et al., 2016), es importante resaltar que fueron empleados de manera aislada, por lo tanto, la utilización de un extracto complejo puede producir un efecto antagónico entre los compuestos biológicamente activos (Wagner, 2006), y de esta manera, se explicaría el por qué no se inhibieron estas enzimas.

Se piensa, que el efecto hipoglucemiante observado en este estudio pueda estar atribuido a los flavonoides glucosilados rutina y ácido clorogénico, específicamente a su capacidad asociada con la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado. Sin embargo, no se descarta que otro tipo de compuestos también puedan estar involucrados, así como otros mecanismos de acción. Los compuestos no identificados en la placa de flavonoides glucosilados podrían ejercer su acción a través de otro mecanismo de acción, como la sensibilización a la insulina, efecto que también se ha observado con los metabolitos rutina y ácido clorogénico al promover la síntesis y la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática.

10. Conclusiones y perspectivas

Se evaluó el efecto del extracto acuoso de *C. integrifolia*, de la cual se tienen reportes previos sobre su uso tradicional para tratar la DM. En el presente trabajo, se comprobó el efecto hipoglucemiante de dicha planta en ratas hiperglucémicas STZ-NA; dicho efecto se observó a partir del tiempo 30 de la prueba (en un grupo con n=6) y al final de ésta los niveles disminuyeron a valores normoglucémicos.

El extracto acuoso de *C. integrifolia* no inhibió ni redujo el pico hiperglucémico durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral en ratas hiperglucémicas STZ-NA.

Se identificó la presencia de dos compuestos fenólicos con actividad hipoglucemiante conocida, ácido clorogénico y rutina. Éstos podrían estar implicados en el efecto y mecanismo de acción de la planta, inhibiendo la expresión transcripcional de G6-Pasa y de PEPCK. Otra posibilidad, es que éstos compuestos también actúen promoviendo la síntesis y expresión en membrana de GLUT4.

Se sugiere realizar más estudios fitoquímicos que permitan una mejor caracterización de los compuestos involucrados en el efecto hipoglucemiante de la planta, y que puedan ayudar a dilucidar el o los posibles mecanismos de acción.

Se requieren de más estudios farmacológicos que ayuden a descartar o corroborar el o los mecanismos de acción involucrados en el efecto hipoglucemiante de *C. integrifolia*. Igualmente se demuestra la utilidad de la etnofarmacología para el análisis de plantas usadas en la MT.

11. Literatura citada

¿Cómo se separa, purifica y analiza un compuesto orgánico? Cromatografía en capa fina (TLC). Universidad Autónoma de Madrid. Descargado 15/10/1018 de: <https://www.uam.es/gruposinv/lumila/personal/ebr/qot/leccion9/default.html>

Aittoniemi, J., Fotinou, C., Craig, T. J., de Wet, H., Proks, P., & Ashcroft, F. M. (2009). SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1514), 257–267. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0142>

AlSaraj, F. (2015). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. Treatment of Type 2 Diabetes. Colleen Croniger, IntechOpen. DOI: 10.5772/59183. Recuperado a partir de <https://www.intechopen.com/books/treatment-of-type-2-diabetes/pathogenesis-of-type-2-diabetes-mellitus>

Amaral, P. de A., Costa, F. V., Antunes, A. R., Kautz, J., Citadini-Zanette, V., Lohézic-Le Dévéhat, F., Barlow, J., & 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. (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, 41(Suppl. 1), S13-S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>

American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37 Suppl 1(Supplement_1), S81-90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>

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

Andrade-Cetto, A. (2008). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.008>

Andrade-Cetto, A. (2015). Diabetes and Metabolic Disorders: An Ethnopharmacological Perspective. In M. Heinrich & A. Jäger (Eds.), *Ethnopharmacology* (Pimera, pp. 227-237). United Kingdom: John Wiley & sons Ltd.

Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2011). From the Field into the Lab: Useful Approaches to Selecting Species Based on Local Knowledge. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 20. <http://doi.org/10.3389/fphar.2011.00020>

Aparoop, D. Shankar. B., Bairy, P., S. (2017). DIABETES MELLITUS AND ANTIDIABETICS WITH REFERENCE TO ALPHA GLUCOSIDASE INHIBITORS. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, 4(6). Recuperado a partir de: <http://www.jbpr.in/index.php/jbpr/article/view/231>

Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S. & Redwan, E. M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13 (141), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>

Becker, M., Galler, A., Raile, K. (2014). Meglitinide Analogues in Adolescent Patients With HNF1A-MODY (MODY 3). *Pediatrics*, 133(3), e775-e779. doi: [10.1542/peds.2012-2537](https://doi.org/10.1542/peds.2012-2537)

Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A., Sivakumar, M. (2005). *Chemistry of Natural Products*. Alpha Science Int'l Ltd. ISBN: 8173194815, 9788173194818

Bohlmann, F., & Zdero, C. (1977). 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)

Bösenberg, L.H., & van Zyl, D.G. (2014). The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*, 13(3), 80-88. DOI: [10.1080/22201009.2008.10872177](https://doi.org/10.1080/22201009.2008.10872177)

Cersosimo, E., Triplitt, C., Solis-Herrera, C., & DeFronzo, R. A. (2018). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. En: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/?report=classic>

Cheng, A. Y. Y., & Fantus, I. G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne*, 172(2), 213-26. <http://doi.org/10.1503/cmaj.1031414>

Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>

CONABIO (2018) EncicloVida. Recuperado el 30 Sep 2018 de <http://enciclovida.mx/especies/196858-calea-integrifolia>

Cornell, S. (2015). Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2015(11), 621-632. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S67387>

Cotton, C. M. (1996). *Ethnobotany: Principles and Applications*. Wiley. ISBN: 047195537X, 9780471955375

De la Vega-Monroy, M. L., & Fernández-Mejía, C. (2011). Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. *Type 1 Diabetes David Wagner, IntechOpen*, DOI: 10.5772/22089. Recuperado a partir de: <https://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy/beta-cell-function-and-failure-in-type-1-diabetes>

DeFronzo, R. A., Ferrani, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., ... Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1-22. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>

Del Prato, S. (2009). Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic Medicine*, 26, 1185-1192. doi:[10.1111/j.1464-5491.2009.02847.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02847.x)

Efron, D., Farber, S. M., Holmstedt, B., Kline, N. L., Wilson, R. H. L. (1970). Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs. Government Printing Office. *Public Health Service Publications No. 1645*. (orig. 1967)

Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., & Essien, N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12(60). <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60>

ENSANUT. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe final de resultados. Instituto Nacional de Salud Pública.*

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

Færch, K., Johansen, N.B., Witte, D. R., Lauritzen, T., Jørgensen, M. E., Vistisen, D. (2015). Relationship Between Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction in Subphenotypes of Prediabetes and Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(2), 707–716, <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2853>

Flores-Oceotl, M. R., Rosas-Murrieta, N. H., Moreno, D. A., Vallejo-Ruiz, M., Reyes-Leyva, J., Domínguez, F., & Santos-López, G. (2018). *Taraxacum officinale* and *Urtica dioica* extracts inhibit dengue virus serotype 2 replication in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(95). <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2163-3>

Forouhi, N. G., & Wareham, N. J. (2014). Epidemiology of diabetes. *Medicine (Abingdon, England : UK Ed.)*, 42(12), 698–702. <http://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.09.007>

Fu, Z., Gilbert, E. R., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 9(1), 25-53.

Gámiz Palma, J. L. (2007). La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. Diabetología para cardiólogos. *Revista Española de Cardiología*, 7(Supl. H), 12H-19H.

Generalic, Eni. (2018). Paper chromatography. *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary*. KTF-Split. Descargado de 15/10/2018 <https://glossary.periodni.com>

Ghasemi, A., Khalifi, S., Jeddy, S. (2014). Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes. *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), 408-20. DOI: 10.1556/APhysiol.101.2014.4.2

Ghorbani, Ahmad. (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>

Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes mellitus tipo 1. (2012). Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes mellitus tipo 1. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Política Social. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del País Vasco-Osteba. Guías de Práctica Clínica en el SNS: OSTEBA n.º 2009/10. Recuperado a partir de http://www.guiasalud.es/GPC/GPC_513_Diabetes_1_Osteba_compl.pdf

Hanan-Alipi, A. M. & Mondragón-Pichardo, J. (2009). Melazas de México, *Alloispermum interifolium* (DC.) H. Rob. 29 Sep 2018. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/alloispermum-integrifolium/fichas/ficha.htm#2.%20Origen%20y%20distribuci%C3%B3n%20geogr%C3%A1fica>

Heinrich, M., & Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 425-432. <https://doi.org/10.1211/0022357011775712>

Hernández-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaría, L., Román-Ramos, R., Chávez-Miranda, A. A., García-Vega, L. M., Flores-Sáenz, J. L., & Alarcón-Aguilar, F. J. (2002). Studies on Hypoglycemic Activity of Mexican Medicinal Plants. *Proc. West. Pharmacol. Soc*, 45, 118-124.

Holmes, H. N., Robinson, J., & Tscheschlog, B. (Eds.). (2007). Diabetes mellitus. A guide to Patient Care (1ª ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Holmstedt, B., Bruhn, J. G. (1983). Ethnopharmacology – A challenge. *Journal of Ethnopharmacology*, 8(3), 251-256. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90062-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90062-4)

INEGI. (2013). Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. Recuperado de <http://fmdiabetes.org/wp-content/uploads/2014/11/diabetes2013INEGI.pdf>

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)

International Diabetes Federation. (2017). *Diabetes Atlas* (8ª ed.). International Diabetes Federation.

Jitrapakdee, S., & Forbes, B. E. (2011). Insulin Secretion and Actions. Medical Complications of Type 2 Diabetes. *Colleen Croniger, IntechOpen*, DOI: 10.5772/21631. Recuperado a partir de: <https://www.intechopen.com/books/medical-complications-of-type-2-diabetes/insulin-secretion-and-actions>

Juárez, V. M. C., Carranza, A. C., Alonso, C. A. J., González, A. V. F., Bravo, A. E., Chamarro, T. F. J., Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 521-527 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.048>

Kerner, W., Brückel, J. (2014). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 122(7), 384-386. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1366278>

Lee, B.-C., & Lee, J. (2014). Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-induced Insulin Resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(3), 446–462. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017>

Leslie, D. R., Palmer, J., Schloot, N. C., & Lernmark, A. (2015). Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment. *Diabetologia*, 59(13), 13-20. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3789-z>

Lima, T. C., de Jesus Souza, R., Santos D.C. A., Moraes, M. H., Biondo, N. E., Barrison, A., Steindel, M., & Biavatti, M. W. (2015). Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. *Natural Product Research*, 30(5), 551-557. DOI: <10.1080/14786419.2015.1030740>

Lima, T. C., Santos, A. D. C., Costa, T. M. D., Souza, J. R., Barrison, A., Steindel, M., Biavatti, M. W. (2015). Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. and evaluation of their leishmanicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(1), 7-10. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.01.004>

Lima, T.C., de Jesus Souza R., da Silva F.A., Biavatti M.W. (2017). The genus *Calea* L.: A review on traditional uses, phytochemistry, and biological activities. *Phytotherapy Research*, 32(5), 769–795. <https://doi.org/10.1002/ptr.6010>

- Linuma, M., Tanaka, T., Ubukata, M., Matsuura, N., Yamada, M., Suzuki, H. 2008. Sesquiterpenoid derivatives having adipocyte differentiation inhibitory effect. *Google Patents*. Descargado de <https://patents.google.com/patent/US20050048135>
- Lorenzati, B., Zucco, C., Miglietta, S., Lamberti, F., & Bruno, G. (2010). Oral Hypoglycemic Drugs: Pathophysiological Basis of Their Mechanism of Action. *Pharmaceuticals*, 3(9), 3005–3020. <https://doi.org/10.3390/ph3093005>
- Mackenzie, R. W., & Elliott, B. T. (2014). Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*, 7, 55-64. doi:10.2147/DMSO.S48260
- Martinez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. FCE, México. ISBN: 9681600118
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-buys, D., ...Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide. *Diabetes*, 47(February 1998), 224-229.
- Mazzola, N. (2012). Review of Current and Emerging Therapies in Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Manag Care*, 18(1), S17-S26.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/801457>
- Mohrig, J. R., Hammond, C. R., Schatz, P. F., & Myers, A. M. (2010). Techniques in Organic Chemistry / Molecular Structure Model Kit and Instruction Manual. Macmillan Higher Education, (3^a ed). ISBN: 1429266147, 9781429266147
- Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, European Association for Study of Diabetes (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, 32(1), 193-203. <https://doi.org/10.2337/dc08-9025>

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=936. Recuperado el 6 Oct. 2018 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/936>

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=29327. Recuperado 6 Oct. 2018 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/29327>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. ISBN 978 92 4 350609 8

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Informe mundial sobre la diabetes. WHO Document Production Services, Ginebra, Suiza. ISBN 978 92 4 356525 5.

Ortíz, V. C. (1995). Fundamentos de fitoquímica. Trillas. ISBN: 9682449405, 9789682449406

Pontarolo, R., Sanches, C. A. C., Wiens, A., Perlin, C. M., Tonin, F. S., Borba, L. H. H., Lenzi, L., & Penteadó, S. T. S. (2015). Pharmacological Treatments for Type 2 Diabetes. Treatment of Type 2 Diabetes. *Colleen Croniger, IntechOpen*, DOI: 10.5772/59204. Recuperado a partir de: [https://www.intechopen.com/books/treatment-of-type-2-diabetes-](https://www.intechopen.com/books/treatment-of-type-2-diabetes/pharmacological-treatments-for-type-2-diabetes-)

Raaman, N. (2006). Phytochemical Techniques. New India Publishing. ISBN: 8189422308, 9788189422301

Radenkovic, M., Stojanovic, M., Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13-31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>

Rains, J. L., Jain, S. K. (2010). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 567-575. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006>

Ramos-Torres, A. Y. (2018). Evaluación del efecto de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. y *Calea integrifolia* (D.C.) Hemsl. sobre la actividad *in vivo* e *in vitro* de las alfa-glucosidasas. (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México.

Riddy, D. M., Delerive, P., Summers, R. J., Sexton, P. M., & Langmead, C. J. (2018). G Protein–Coupled Receptors Targeting Insulin Resistance, Obesity, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacological Reviews*, 70 (1) 39-67. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014373>

Rieusset, J. (2018). The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update. *Cell Death & Disease*, 9(388). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0416-1>

Rockefeller, J.D. (2015). Diabetes: Symptoms, Causes, Treatment and Prevention. *J. D. Rockefeller*, Smashwords Edition. 42p.

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

Rutter, G. A., Pullen, T. J., Hodson, D. J., Sanchez-Martinez, A. (2015). Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochemical Journal*, 466(2), 203-218. DOI: [10.1042/BJ20141384](https://doi.org/10.1042/BJ20141384)

Rzedowski, G. C., & Rzedowski, J. (2008). Compositae. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*, Fascículo 157. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.

Sałaga, M., Fichna, J., Socala, K., Nieoczym, D., Pieróg, M., Zielińska, M., Kowalczyk, A., ... Wlaż, P. (2016). Neuropharmacological characterization of the oneirogenic Mexican plant *Calea zacatechichi* aqueous extract in mice. *Metabolic brain disease*, 31(3), 631-41. doi: [\[10.1007/s11011-016-9794-1\]](https://doi.org/10.1007/s11011-016-9794-1)

Schwartz, S. S., Epstein, S., Corkey, B. E., Grant S. F. A., Gavin, J. R., & Aguilar, R. B. (2016). The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the β Cell–Centric Classification Schema. *Diabetes Care*, 39(2), 179-186. <https://doi.org/10.2337/dc15-1585>

Sherma, J., & Fried, B. (2003). Handbook of Thin Layer Chromatography. CRC Press, (3^a ed). ISBN: 0824748662, 9780824748661

Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & Van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365, 1333-46. [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 (1^a Ed.) ISBN: 978-1482249897

Szkudelski. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*, 237(5), 481-490. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.011372>

Szoke, E., & Gerich, J. E. (2005). Role of Impaired Insulin Secretion and Insulin Resistance in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Comprehensive Therapy*, 31(2), 106-112.

Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., & Shibasaki, M. (2008). Hypoglycaemic Effects of Antidiabetic Drugs in Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Mildly Diabetic and Streptozotocin-Induced Severely Diabetic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 103(6), 560-568. DOI: [10.1111/j.1742-7843.2008.00321.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00321.x)

Taiz, L., & Zeiger, E. (2007). Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. ISBN: 8480216018, 9788480216012

Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456–480. <http://doi.org/10.4239/wjd.v6.i3.456>

Taverna, M.J. (2018) Epidemiology of Diabetes. En: Cohen Sabban E., Puchulu F., Cusi K. (eds) *Dermatology and Diabetes*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72475-1_1

Thomas, C. C., & Philipson, L. H. (2015). Update on Diabetes Classification. *Medical Clinics of North America*, 99(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.015>

Tomita, T. (2016). Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes. *Bosnian Journal Of Basic Medical Sciences*, 16(3), 162-179. <http://dx.doi.org/10.17305/bjbms.2016.919>

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 29 Sep 2018. <http://www.tropicos.org/Name/2726204> *Calea integrifolia*

Lazo-de-la-Vega-Monroy, M. L., Fernandez-Mejia, C. (2011). Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy David Wagner, IntechOpen, DOI: 10.5772/22089. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy/beta-cell-function-and-failure-in-type-1-diabetes>

Wagner, H. (2006). Futuro de la investigación en fitoterapia: Tendencias y Retos. *Fitoterapia*, 6(2), 101-117. Recuperado de <https://studylib.es/doc/7505975/futuro-en-la-investigaci%C3%B3n-en-fitoterapia--tendencias-y-r...#>

Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press. ISBN: 1420046780, 9781420046786

Weiss, M., Steiner, D. F., Philipson, L. H. (2014). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. En: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors, *Endotext [Internet]*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Recuperado a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>

Zaccardi, F., Webb, D., R., Yates, T., Davies, M., J. (2015). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*, 0, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133281>