



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio del efecto de *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. sobre la actividad de α -glucosidasas en ratas STZ-NA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A:

Arturo Coyotecatl Franco

DIRECTOR DE TESIS:

Adolfo Andrade Cetto



Ciudad Universitaria, CD. MX. , 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:

Coyotecatl

Franco

Arturo

26513053

Universidad Autónoma de

México

Facultad de Ciencias

310144986

2. Datos del tutor

Dr

Andrade

Catto

Adolfo

3. Datos del sinodal 1

Dr

Cárdenas

Vázquez

René de Jesús

4. Datos del sinodal 2

Dra

Jacobo

Herrera

Nadia Judith

5. Datos del sinodal 3

M en C

Cabello

Hernández

Christian Alan

6. Datos del sinodal 4

Dra

Samario

Román

Jazmín Selene

7. Datos del trabajo escrito

Estudio del efecto de Ageratina petiolaris (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. sobre la actividad de α -glucosidasas en ratas STZ-NA

39p

2019

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme todo lo necesario para desarrollarme profesionalmente y personalmente dentro de sus instalaciones, además de proporcionarme los medios suficientes en conocimiento.

Al proyecto DGPA PAPIIT con clave In226719 por el financiamiento parcial del presente trabajo.

Al PUIC, que me apoyó durante los últimos años de la carrera proporcionándome una beca.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, por permitirme ser parte de su equipo de laboratorio, por apoyarme en todo momento en la realización en éste trabajo siendo mí tutor y haberme tenido paciencia.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por apoyarme en las correcciones de esta tesis, así como asesorarme en temas relacionados a este campo de trabajo.

A la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera por ser parte de mis sinodales y un gran apoyo emocional.

A la Dra. Jazmín Selene Samario Roman por apoyarme en muchos temas y ser una gran profesora durante la Carrera.

Al M. en C. Christian Alan Cabello Hernández por ser parte de mí grupo de sinodales y haber sido un gran apoyo en mis experimentos, así como un gran profesor.

Agradecimientos personales

A dios por todo lo que me ha dado y permitirme seguir luchando cada día.

A mis padres Sandra y Arturo, porque a ellos les debo todo lo que soy, son mí fuerza, mí soporte y mi guía, ya que me han enseñado a soportar en los momentos más duros, es por ellos que he llegado hasta ésta instancia y seguiré luchando para que su esfuerzo valga la pena.

A mis hermanos, Omar, el mayor que ha sido un ejemplo de trabajo, perseverancia y resistencia, aparte de apoyarme en los momentos difíciles. A Itzel, que me ha enseñado a tomar las cosas con calma, a ser tolerante y a tener paciencia. A Xanath, que me ha apoyado en la realización de la tesis. A Mayra y David, que han compartido toda su vida junto a mí y a Raymundo, el más pequeño, una razón para seguir vivo y mí motivo para levantarme en los momentos más críticos de enfermedad.

A la “güera”, que me apoyó durante muchos años, siempre confiando en las capacidades que tengo y cuidando de mí, una maestra de vida que llegó para enseñarme muchas cosas que no conocía.

A mis maestros de laboratorio que me han apoyado desde que los conocí, a Artemisa que me ha ayudado a corregir ésta tesis, a asesorarme, a apoyarme y por ser una muy buena profesora, siempre paciente y tolerante. A Gerardo, un profesor que me ha explicado las cosas de una manera muy fácil de comprender y a resolver todas mis dudas. A Dany que me apoyó en la realización de éste trabajo, siempre dispuesta a ayudarme.

A mis compañeros de laboratorio Samantha, Alejandra, Jimena y Omar, hicieron un ambiente agradable brindandome su amistad.

Al Dr. Carlos Pedraza Lara, por ser un amigo, por apoyarme académica y emocionalmente.

A Thelma, Alejandra, Ragde y Roberto, mis amigos de primer semestre, por estar conmigo y confiar en mí.

A mí Coco

*Mi razón para escribirlo,
y sin siquiera pedirlo,
a mi vida llegó en sigilo,
maulló sólo para decirlo
y me siento muy agradecido
que te hayas puesto en mi camino,
a ti, mí chulo y hermoso cocodrilo.*



Índice

| | |
|---|----|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 3. Antecedentes | 3 |
| 3.1 Diabetes mellitus | 3 |
| 3.2 Clasificación | 3 |
| 3.3 Prevalencia | 4 |
| 3.4 Síntomas | 5 |
| 3.5 Diagnóstico | 6 |
| 3.6 Hiperglucemia | 7 |
| 4. Digestión y absorción de carbohidratos | 8 |
| 5. Hipoglucemiantes orales | 10 |
| 5.1 Acarbosa | 11 |
| 6. Modelos animales | 12 |
| 7. Modelo STZ-NA | 13 |
| 8. Etnofarmacología | 15 |
| 8.1 Plantas de México para el tratamiento de la diabetes mellitus 2 | 15 |
| 8.1.1 Antecedentes de <i>Ageratina petiolaris</i> | 16 |
| 9. Objetivos generales | 19 |
| 9.1 Objetivos Particulares | 19 |
| 10. Hipótesis | 19 |
| 11. Justificación | 20 |

| | |
|---|----|
| 12. Metodología | 21 |
| 12.1 Preparación del material biológico | 21 |
| 12.2 Elaboración de extracto acuoso | 21 |
| 12.3 Manejo de animales de laboratorio | 21 |
| 12.4 Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA | 22 |
| 12.5 Medición de glucosa plasmática | 22 |
| 12.6 Grupos experimentales | 23 |
| 12.7 Preparación y administración de tratamientos | 23 |
| 12.8 Obtención de disacaridasas de intestino de rata y <i>S. cerevisiae</i> | 23 |
| 12.9 Ensayos enzimáticos de inhibición de α -glucosidasas | 24 |
| 12.10 Estadística | 24 |
| 13. Resultados | 25 |
| 13.1 Curva de tolerancia a la sacarosa | 25 |
| 13.2 Ensayo in vitro de actividad de enzimas α -glucosidasas | 27 |
| 14. Discusión | 29 |
| 15. Conclusión | 32 |
| 16. Referencias | 33 |

1. Resumen

Una de las enfermedades con mayor prevalencia en el mundo es la diabetes mellitus tipo 2, por lo cual se ha investigado sobre las plantas utilizadas en la medicina tradicional en busca de nuevos principios activos que puedan ser desarrollados como fármacos para mejorar el estado de salud de las personas y tratar ésta enfermedad. Con la evaluación de extractos obtenidos de plantas, se busca conocer sus mecanismos de acción. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* en la actividad de las enzimas α -glucosidasas a nivel intestinal, por lo que se probó dicho extracto en pruebas de tolerancia a sacarosa en ratas hiperglucémicas STZ-NA, así como en ensayos *in vitro* utilizando el extracto crudo de intestino de rata y enzimas de *Saccharomyces cerevisiae*. Se obtuvo como resultado que el extracto no inhibió a las enzimas en los ensayos *in vitro*, sin embargo, se observó que evita el pico hiperglucémico significativamente comparándolo contra los grupos controles en la prueba de tolerancia a la sacarosa. Por lo anterior, se concluye que el extracto presenta un mecanismo de acción hipoglucemiante, diferente a la inhibición de enzimas α -glucosidasas.

2. Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por una deficiencia en la acción y/o secreción de la insulina, lo que provoca hiperglucemia. Este padecimiento se ha convertido en un grave problema de salud a nivel mundial la federación internacional de diabetes (FID 2015) tiene un registro de 425 millones de personas que la presentan, es decir una de cada 11. Nuestro país ocupa el quinto lugar con un aproximado de 12 millones de personas (Ogurtsova, 2017). Esto genera un alto costo económico que aumenta cada año, ya que se ha convertido en una de las principales causas de mortalidad asociada con múltiples factores, desde genéticos, hasta ambientales (Dirección General de Epidemiología, 2013). La DM2 afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, lo que provoca un conjunto de síntomas que dan como resultado una serie de complicaciones. No existe cura para esta enfermedad, sin embargo, hay fármacos para su tratamiento, lo que se complementa con un estilo de vida donde se incluya el ejercicio y una alimentación balanceada (González-Villapando, 1992).

México es un país multicultural lo que da paso a creencias y tradiciones por parte de las diferentes etnias con respecto a los recursos naturales que poseen. El conocimiento de uso de plantas para tratar enfermedades permite estudiar sus componentes y propiedades, así como sus características, y gracias a la diversidad floral hay plantas que son utilizadas para diferentes enfermedades (Xiaorui, 1998). Se tiene un registro de 306 especies de plantas que son utilizadas para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). El presente estudio tuvo por objetivo probar el extracto de una planta usada en la medicina tradicional para el tratamiento de la DM2 evaluando su efecto sobre la absorción intestinal de glucosa, pretendiendo comprobar el posible mecanismo de acción del extracto.

3. Antecedentes

3.1 Diabetes mellitus

La DM2 es definida como un conjunto de enfermedades metabólicas que tienen como característica en común hiperglucemia, debido a una alteración en la secreción y/o acción de insulina (De Fronso *et al.*, 2015). Su patogenia se asocia con múltiples factores, entre los que se encuentran: componente genético, estilo de vida, sedentarismo y obesidad (Bradfield *et al.*, 2011). La diabetes representa un importante problema, debido al costo monetario que tiene el tratamiento, así como a la carga de la morbilidad y la mortalidad asociadas con la misma según la Federación Internacional de Diabetes (FID, 2017).

3.2 Clasificación

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (2018) se reconocen principalmente 3 tipos de diabetes:

Diabetes tipo 1

Este tipo es generado a partir de una reacción autoinmune, por lo que el sistema de defensa corporal ataca las células beta, productoras de insulina en el páncreas, lo que da como resultado que el organismo no genere insulina para mantener la homeostasis de glucosa y se produzca hiperglucemia (FID 2017).

Se detecta principalmente en niños y jóvenes adultos antes de 30 años. A partir de esta enfermedad las personas necesitan de insulina exógena todos los días para poder sobrevivir. Este tipo de diabetes representa del 5 al 10% de las personas en el mundo (ADA, 2018).

Diabetes tipo 2

En este tipo de diabetes el organismo presenta trastornos en la secreción y/o acción de la insulina, lo que genera hiperglucemia. Aunado a ello se presentan una serie de fallas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Por esta causa, con el tiempo los niveles de glucosa llegan a ser más elevados (FID, 2017).

La etiología de esta enfermedad es atribuida a varios factores como la mala alimentación, sedentarismo y principalmente obesidad; de este último factor se han realizado estudios para concluir que es el que genera la aparición de DM2, ya que es el que genera resistencia a la insulina (Organización Mundial de la Salud, 2012; Rosen-MacDougald, 2006, Najera *et al.* 2016).

Diabetes gestacional

Puede producirse durante cualquier periodo de gestación, a pesar de esto suele ocurrir a partir de la semana 24. Es caracterizada por un estado de hiperglucemia temporal. En este caso los niveles de glucosa regresan a la normalidad al finalizar el embarazo, sin embargo, se ha visto que puede llegar a generar DM2 posterior al embarazo tanto para el bebé y la madre (Organización Mundial de la Salud, 2014).

3.3 Prevalencia

Diabetes a nivel mundial

La diabetes es un problema mundial, afectando a las personas en su edad más productiva debido a los costos del tratamiento, empobreciendo a las familias y reduciendo la esperanza de vida. La carga de diabetes minimiza los presupuestos sanitarios nacionales, frena el crecimiento económico, genera gastos en hogares vulnerables y sobrecarga los sistemas sanitarios (FID, 2017).

La diabetes es una de las mayores emergencias sanitarias mundiales del siglo XXI. Está entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial junto con las otras tres principales enfermedades: enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedades respiratorias. Uno de los principales potenciadores del problema de la diabetes es que entre un 30 y un 80% de las personas con diabetes no están diagnosticadas (FID, 2017).

Diabetes en México

Esta enfermedad en nuestro país presentó un incremento del 2015 al 2017 de 500 mil habitantes nuevos diagnosticados (FID, 2015; FID, 2017). Para el año 2017 se estima que existen 570 mil personas sin diagnosticar diabetes, si se continua con esta tendencia se estima que para el año 2045 en nuestro país se encuentren 21.8 millones de personas diagnosticadas (FID, 2017). Como ya se mencionó, la FID (2017) tiene registro de 12 millones de personas con diabetes.

Cifras preliminares emitidas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) para el año 2012, estiman que la diabetes es la segunda causa de muerte en la población mexicana, con una tasa de mortalidad de 75 defunciones por cada 100 mil habitantes. Además, su incidencia ha presentado un incremento acelerado en los últimos 15 años, ya que en el año de 1998 presentó una tasa de mortalidad de 42.5 defunciones por cada 100 mil habitantes (INEGI, 2012).

3.4 Síntomas

Una persona con DM2 secreta inadecuadamente insulina o bien, presenta resistencia a dicha hormona, lo que trae como consecuencia hiperglucemia. En la mayoría de las personas este padecimiento es asintomático en etapas tempranas, sin embargo, los síntomas aparecen cuando la enfermedad ya es avanzada, lo que fuerza al organismo a regular la glucosa excesiva en la sangre, tratando de eliminar la glucosa a través de la orina (glucosuria). Esto genera deshidratación y la persona tiende a beber grandes cantidades de agua para reponer los líquidos perdidos lo que se denomina como polidipsia (ADA, 2018).

Ya que el cuerpo no logra asimilar glucosa, la cual juega un papel determinante en la obtención de energía, los músculos pierden energía para su contracción y se da el fenómeno de astenia, en el cual las personas presentan cansancio, lo que conlleva a una pérdida de peso a pesar de la ingesta excesiva de alimentos, a este otro síntoma se le conoce como polifagia (ADA, 2018).

3.5 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la diabetes se emplean los criterios descritos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2018) los cuales están basados en los siguientes métodos y se muestran valores de glucosa en el cuadro 1:

- Hemoglobina glicada (HbA1c). Con esta prueba se logra medir la cantidad de hemoglobina que se glicosila en la sangre, no es necesaria una carga de glucosa o un ayuno para su realización.
- Prueba de glucosa en ayuno. Consiste en la medición de glucosa en sangre con un ayuno de 8 a 12 horas.
- Prueba de tolerancia a la glucosa. Esta prueba se realiza después de haber medido la glucemia en ayuno para posteriormente dar una carga de glucosa oral (75g de glucosa anhidra) disuelta en agua. Después de la ingesta se realizan mediciones de glucosa cada 30 o 60 minutos, con una duración de 2 a 3 horas.
- Prueba de glucosa al azar. Se realiza cuando se cree que se presenta la enfermedad por la aparición de síntomas y se mide la glucosa en cualquier momento.

| Diagnóstico DM2 | | |
|-------------------------|---------------------|-------------|
| Prueba | Prediabetes | Diabetes |
| HbA1c | 5.7% a 6.4% | ≥ 6.5% |
| Glucosa en ayuno | 100mg/dl a 125mg/dl | ≥126 mg/dl |
| Tolerancia a la glucosa | 140mg/dl a 199mg/dl | ≥ 200 |
| Glucosa al azar | | > 200 mg/dl |

Cuadro 1. Valores de glucosa que determinan el diagnóstico de prediabetes y DM2 (ADA, 2018).

3.6 Hiperglucemia

La glucosa es un monosacárido que se encuentra libre en la sangre de todos los mamíferos, se oxida en las células dando como resultado una fuente de energía y se almacena en el hígado en forma de glucógeno y el músculo esquelético (Hernández, 2010). La insulina favorece la homeostasis de la glucosa, esta es una hormona secretada por el páncreas, la glucosa es absorbida por diferentes órganos, dando como resultado una correcta asimilación de la glucosa.

En una persona con DM2 la homeostasis de la glucosa se ve alterada; en una menor activación del transportador de glucosa GLUT 4 en los tejidos dependientes, reduciendo su síntesis, o interfiriendo con su translocación desde el citosol a la membrana, así como una baja captación de glucosa por el tejido muscular y adiposo, lo cual produce hiperglucemia. Al presentarse hiperglucemia crónica, con el tiempo se dan a una serie de complicaciones metabólicas agudas y crónicas. Las agudas comprenden un aumento o disminución de la cantidad normal de glucosa o bien llamadas hipoglucemia o hiperglucemia severa (Guzmán *et al.*, 2010).

Las complicaciones crónicas son diversos padecimientos que se presentan a causa de esta enfermedad provocando incapacidad prematura y defunciones en los pacientes diabéticos (Guillén González, 2002). Generan alteraciones en órganos donde se incluyen las llamadas “complicaciones microvasculares” como la retinopatía, nefropatía, neuropatía, y también las “complicaciones macrovasculares” como la enfermedad arterial periférica, el accidente cerebrovascular y la enfermedad coronaria (Guzmán, *et al.*, 2010).

4. Digestión y absorción de carbohidratos

La glucosa es la principal fuente de energía en la naturaleza, por lo que su transporte al interior celular es un proceso esencial para la vida; el transporte de glucosa es llevado a cabo por dos familias de proteínas de membrana: los transportadores de glucosa acoplados a sodio (SGLT) y las proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (GLUT) (Castrejón, *et al.* 2007) (fig. 1).

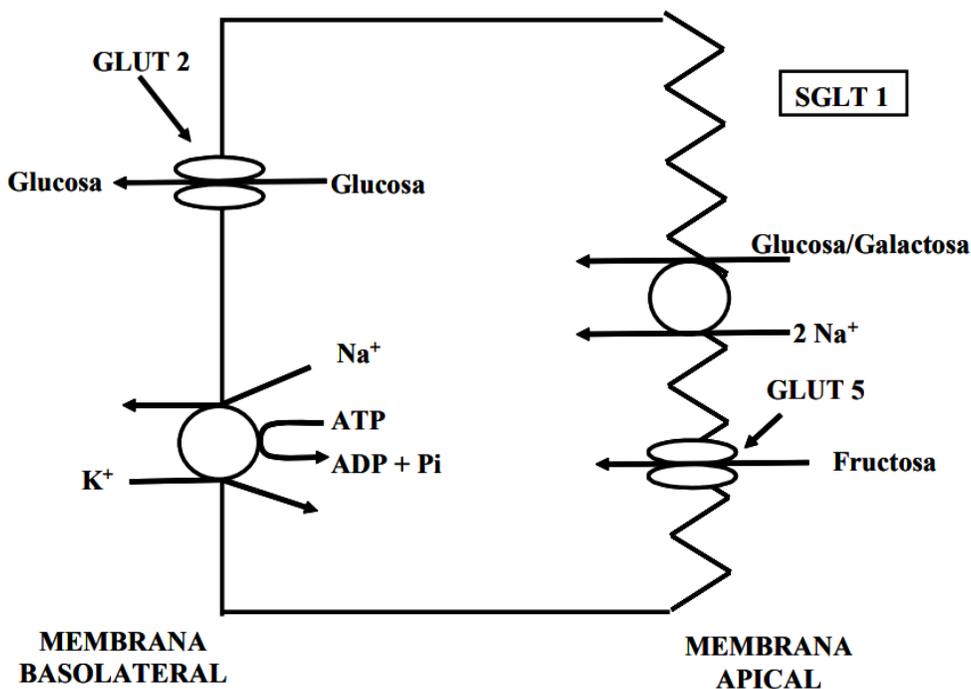


Figura 1. Transporte de glucosa a través del epitelio intestinal. La glucosa entra a través de las células epiteliales por medio de los SGLT presentes en la membrana apical. Posteriormente sale de las células epiteliales por sistemas facilitadores de transporte localizados en la membrana basolateral (Imagen de Castrejón, *et al.* 2007).

El SGLT se presenta en epitelios y son responsables de la absorción y reabsorción de nutrientes, los GLUT están presentes en todos los tipos celulares y se encargan de transportar la glucosa de un lugar a otro (Hernández-Herrera, 2002).

Los carbohidratos consumidos por los organismos son principalmente polisacáridos, por lo tanto, se requiere de una maquinaria enzimática que permita desdoblarlos (Jocković, 2013). Estas enzimas se nombran α -glucosidasas y se clasifican respecto al organismo que las posee como I y II (Kimura, 2000). Las enzimas tipo II, presentes en mamíferos, plantas y hongos, se encargan de desdoblar sustratos

homogéneos como la maltosa, maltotriosa e isomaltosa. (Jocković, 2013). En mamíferos, estas enzimas se localizan en el borde de las células del cepillo intestinal (enterocitos) en intestino delgado, su actividad ha sido identificada en el duodeno y el tercio superior del yeyuno, distal al ligamento de Treitz (Lagmang y Rowland, 1990). Se han identificado tres complejos: sacarosa-isomaltasa, maltasa y glucoamilasa. Particularmente, la sacarosa es hidrolizada por medio del complejo sacarosa-isomaltasa (Hoefsloot *et al.*, 1988) (fig. 2).

Complejos para la digestión y absorción de sacáridos.

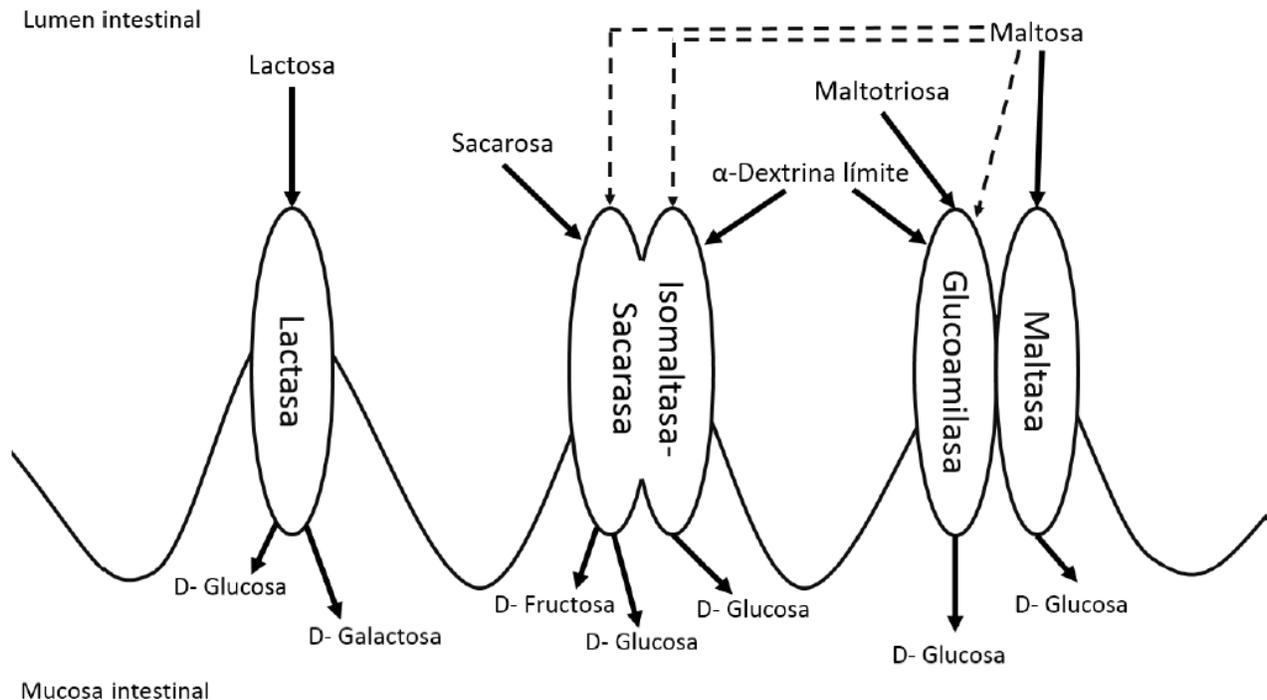


Figura 2. Esquema de mucosa intestinal de mamíferos donde se muestra Maltasa, Isomaltasa-Sacarasa y Glucoamilasa las cuales son II, y se muestra como cada una tiene actividad para diferentes sacáridos (modificado de Caspary, 1992).

Por otra parte, las enzimas α -glucosidasas I presentes en bacterias, levaduras e insectos se caracterizan por presentar una alta afinidad a los sustratos heterogéneos como la sacarosa, p-nitrofenol- α -D-glucopiranosido (p-NPG) y aril α -glucósidos (Kimura, 2000). Ambas familias de enzimas α -glucosidasas (I, II) pueden ser inhibidas competitivamente por acarbosa o isoacarbosa. (Chakrabarti *et al.*, 1993; Kim *et al.* 1999).

5. Hipoglucemiantes orales

Los hipoglucemiantes orales son un conjunto de fármacos que se caracterizan por generar una disminución en los niveles de glucosa en el organismo después de su administración vía oral (Ruiz, 1999; Masharani, 2005).

Los más utilizados en la actualidad son (OMS, 2014):

- Sulfonilureas: estimulan la secreción de insulina por parte de los islotes pancreáticos.
- Meglitinidas: promueven la secreción de insulina sobre las células beta en un sitio distinto a las sulfonilureas.
- Biguanidas: reducen la síntesis hepática de glucosa, inhiben su absorción intestinal y aumentan la sensibilidad periférica de la insulina.
- Tiazolidinedionas: mejoran la sensibilidad celular a la insulina.
- Inhibidores de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4): son un tipo de medicamento de acción incretina que bloquean la acción de la enzima DPP-4. Esto hace que el GLP-1 dure más y aumenta la cantidad de GLP-1 en la sangre. Mientras más GLP-1, menos acumulación de glucosa en la sangre.
- Inhibidores de alfa-glucosidasas: retrasan la absorción y digestión de los azúcares en el tubo digestivo, los integrantes de este grupo son: la acarbosa y miglitol.

Cada clase de medicamento posee indicaciones terapéuticas asociadas a características de los pacientes, así como el grado de la enfermedad. Se toman en cuenta las posibles enfermedades extras que presente el paciente, sin dejar de lado aspectos como el peso, la estatura y sexo (Altagracia-Martínez, *et al.*, 2007) para este estudio se utilizó acarbosa que es un inhibidor de las enzimas alfa-glucosidasas.

5.1 Acarbosa

El fármaco utilizado en este trabajo como control positivo es acarbosa, la cual es un pseudotetrasacárido de origen microbiano que inhibe competitivamente a las enzimas α -glucosidasas, que están presentes en las células del borde de cepillo en las vellosidades intestinales, esto conlleva a una disminución de la hiperglucemia postprandrial tanto en animales de experimentación como en seres humanos diabéticos (Mesa, *et al.* 2001).

La acarbosa es mayormente degradada en el intestino. Algunos de los productos de la degradación y cantidades mínimas del fármaco pasan a la circulación, sin embargo, son eliminados a través de la orina y las heces fecales. El fármaco y sus metabolitos son excretados casi por completo en uno o dos días (Taylor, 1990; Hanefeld, 1993). En la investigación biomédica el estudio y descubrimiento de nuevos fármacos pasa por dos etapas: la clínica y preclínica. En la etapa preclínica se utilizan modelos animales.

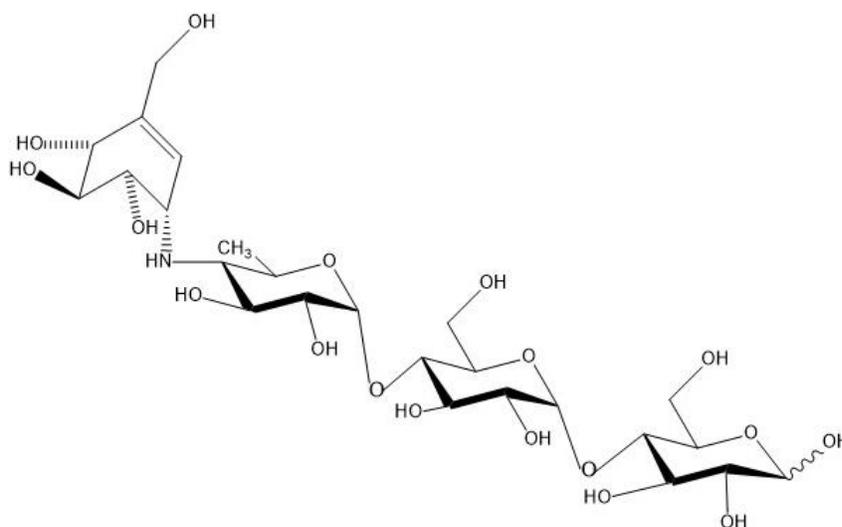


Figura 2. Estructura química de Acarbosa.

6. Modelos animales

Los modelos animales utilizados para el estudio de enfermedades humanas han sido utilizados en distintas áreas de la investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina. Se requieren tanto para proyectos de investigación como en pruebas diagnósticas, terapéuticas y en los controles de productos farmacológicos (Rodríguez, 2007; Arias, 2007).

En el caso de la DM2 se encuentra un gran rango de posibilidades de usar diferentes modelos. En algunos animales predomina la resistencia a la insulina y otros presentan disfunción de las células β . Sin embargo, hay modelos donde la intolerancia a la glucosa es parte de un fenotipo más complejo, tal como el que incluye obesidad, dislipemia e hipertensión, que podrían generar información valiosa para el estudio de esta enfermedad (Barbosa-da-Silva *et, al.* 2014; Brito-Casillas *et, al.* 2016).

Los modelos animales de DM2 se pueden clasificar en espontáneos e inducidos: los espontáneos se dividen en dos categorías, análogos e intrínsecos; por otro lado, los modelos inducidos son generados a partir de administración de hormonas, fármacos o manipulación genética, sin dejar de mencionar los que son inducidos por administración de dieta (Barbosa-da-Silva *et, al.* 2014; Brito-Casillas, *et, al.* 2016).

Los principales modelos animales utilizados, por su forma de controlar el grado de generar enfermedad son los inducidos, algunos de ellos son:

Cuadro 2. Características de modelos animales inducidos con fármacos y hormonas (Brito-Casillas, *et, al.* 2016).

| Modelo | Característica |
|------------------------------------|--|
| •Producción Inducida | |
| -Administración de fármacos | Están basados en la administración de determinadas sustancias con efectos tóxicos sobre las células β . Por ejemplo, la estreptozotocina (STZ), un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer, induce DM2 en roedores recién nacidos no predispuestos, mediante la destrucción de sus células β . Otro fármaco utilizado a veces con el mismo fin es el aloxano. La STZ es un derivado de la |

| | |
|----------------------------|---|
| | nitrosoarea aislado del <i>Streptomyces achromogenes</i> con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro, se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucocinasa, e induce múltiples puntos de ruptura en la doble hélice del DNA. |
| -Inducción hormonal | La administración de corticoides puede causar un estado similar a la DM2 humana, este modelo sería especialmente apropiado para el estudio de la DM2 que aparece en humanos en tratamiento esteroideo crónico por otro motivo. Otras hormonas que pueden causar hiperglicemia en animales son la somatostatina, el glucagon, las catecolaminas y la tiroxina. |

A pesar de la cantidad de modelos existentes para el estudio de la diabetes se debe tener en cuenta que la mayoría asemeja una característica de la enfermedad y depende del investigador utilizar el que ayude a cumplir sus objetivos.

7. Modelo STZ-NA

El modelo estreptozotocina-nicotidamina (STZ-NA) es un modelo de hiperglucemia inducido con la administración de estos fármacos a distintas dosis. Fue descrito por Masiello *et al.* 1998 y obtenido a partir de la inducción de STZ, el cual es un fármaco aislado del hongo *Streptomyces achromogenes* (fig. 3A). Tiene actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro (Bono, 1976). Posee la acción de un potente agente alquilante que dificulta el transporte de glucosa, además de generar metilación con múltiples puntos de ruptura en la doble hélice del ADN (Bolzán, 2002). La STZ daña selectivamente a las células β pancreáticas a causa de la afinidad con el transportador de glucosa GLUT2 a través de la membrana plasmática.

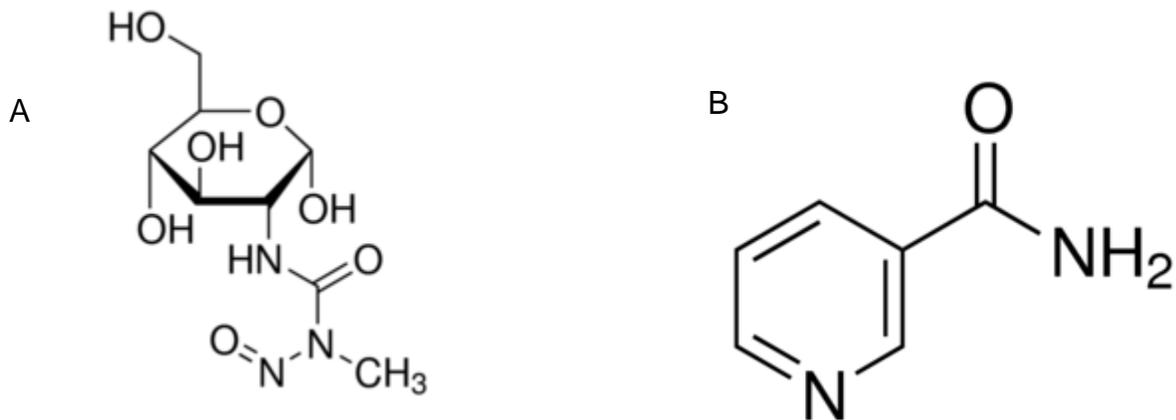


Figura 3. Estructura química de compuestos usados en el modelo STZ-NA. A) Estreptozotocina, B) Nicotinamida (Imagen de www.sigmaaldrich.com).

Una vez dentro de la célula, la transferencia del grupo metilo de STZ causa daños al ADN, que a lo largo de una cadena definida de eventos dan como resultado la fragmentación del mismo (Pieper *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1981). En el intento de reparación del ADN, la enzima poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP-1) es sobre estimulada, generando una disminución celular del nicotin adenin dinucleótido (NAD⁺) y sucesivamente de ATP (Uchigata *et al.*, 1982; Schein, 1986; Sandler, 1983). El agotamiento de las reservas de energía celular, en última instancia resulta en necrosis de las células beta. La metilación del ADN es responsable de la muerte y disminución de las células beta.

Por otra parte, el NA posee un efecto protector de la célula β a diversos niveles (fig. 3B). Este compuesto protege frente a la acción de tóxicos de las células β , disminuye la inflamación en los islotes y los protege ante la acción de radicales libres, antagoniza la acción de citocinas e inhibe la síntesis de óxido nítrico, de igual manera previene la disminución de NAD⁺ en la célula, mediante la inhibición de la acción de la enzima (PARP-1), protege a las células del islote y mejora la respuesta de insulina al estímulo glucémico. En modelos experimentales con diabetes espontánea o inducida, se ha observado un incremento en la regeneración de las células β pancreáticas (Licea *et al.*, 2013).

A partir de la selección de un modelo animal se tiene la posibilidad de probar distintos compuestos para un tratamiento específico, en este caso para la diabetes

tipo 2 junto con técnicas de la etnofarmacología, que son útiles en la selección de plantas como posibles agentes terapéuticos.

8. Etnofarmacología

Esta disciplina puede ser definida como “el estudio de los productos naturales biológicamente activos, utilizados tradicionalmente, con el objetivo de comprender sus acciones terapéuticas” (Andrade-Cetto y Heinrich, 2011). Hace uso de otras ciencias como: la biología, química, farmacología, entre otras. Para la elección y uso de plantas se utilizan diferentes índices, los cuales dan al investigador la posibilidad de generar un mejor resultado respecto a la elección de una planta, con base en su utilización y selección.

El propósito de los estudios etnofarmacológicos de campo tienen como finalidad obtener plantas de uso tradicional con el objetivo de comprender acciones farmacológicas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2011), estos estudios son importantes con respecto al uso del conocimiento tradicional.

8.1 Plantas de México para el tratamiento de la diabetes mellitus 2

En México la segunda causa de muerte se debe a la DM2 (Ogurtsova, 2015; INEGI, 2012), el conocimiento de la medicina tradicional mexicana se considera como un recurso fundamental para la salud, así como un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas y genera alternativas terapéuticas para distintas enfermedades, para lo cual existe registro y estudio de diferentes plantas, hongos o animales (Biblioteca digital de la Medicina tradicional Mexicana, 2012).

Particularmente existe un único registro de 306 especies de plantas reportadas para México que son usadas para el tratamiento de la diabetes en la medicina tradicional, a pesar de esto no se cuenta con información de cada una de las especies acerca de las propiedades fitoquímicas o farmacológicas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

En este trabajo se utilizó *Ageratina petiolaris* debido a que en estudios de campo anteriores fue mencionada y seleccionada como agente hipoglucemiante (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Bustos-Brito *et al.*, 2016).

8.1.1 Antecedentes de *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé EX DC. R.M. King & H. Rob.)

Esta planta presenta una distribución en varios estados de la República Mexicana: Tamaulipas, Nuevo León, Estado de México, Oaxaca, Guerrero, y la ciudad de México, entre otros (fig. 4). En algunos lugares es llamada comúnmente “amargocilla”, “hierba del ángel” o “Yolochichitl” por su nombre en náhuatl (fig. 5) (Conabio, 2015).

Clasificación.

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Ageratina*

Especie: *Ageratina petiolaris*

Ageratina petiolaris



Figura 4. *Ageratina petiolaris* (Imagen de <http://unibio.unam.mx>)



Figura 5. Distribución de *Ageratina petiolaris*. Distribución de la planta de estudio en México, en color verde los estados donde hay registro de recolectas (Imagen de <http://unibio.unam.mx>).

Sobre sus antecedentes fitoquímicos se han realizado fracciones del extracto acuoso destacando el ácido clorogénico y el L-quirositol (fig. 6) a los cuales se les han atribuido propiedades hipoglucemiantes (Bustos-Brito *et al.*, 2016).

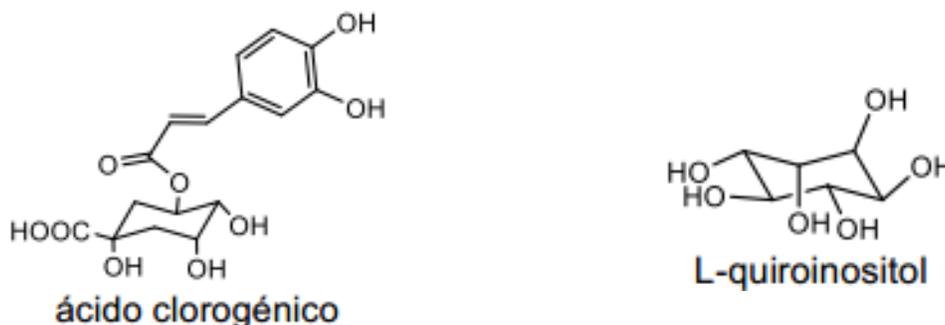


Figura 6. Estructura química de Ácido clorogénico y L-quirositol. A estos compuestos se le atribuyen propiedades hipoglucemiantes.

En otros trabajos se ha reportado que el L-quirositol presenta un efecto que promueve la translocación de GLUT4 dependiente de glucosa en los miotubos de ratas L6, presentes en musculo esquelético (Thomas *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2007)

De igual manera se comprobó el efecto hipoglucemiante agudo de ambos extractos (acuoso y metanólico) de la parte aérea de la planta, esto en ratas STZ-NA a una dosis de 65 mg/kg, i.v.; 150 mg/kg, i.p. A partir de este experimento se observó que reducía significativamente la hiperglucemia con respecto al control hiperglucémico, con esto se concluyó que el extracto acuoso era el más indicado a una dosis de 160 mg/kg (Bustos-Brito *et al.*, 2016).

A partir de esto se realizó otro estudio, en el cual se observó que el extracto acuoso a la misma dosis suprimía la liberación de glucosa hepática, a través de la inhibición de la glucosa-6-fosfatasa, utilizando como control comparativo ácido clorogénico y concluyendo que uno de los posibles mecanismos de *A. petiolaris* es la inhibición de la gluconeogénesis (Espinoza, 2017).

9. Objetivo

9.1 Objetivo General

-Evaluar el efecto del extracto acuoso de *A. petiolaris* en la actividad de las enzimas α -glucosidasas.

9.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto del extracto acuoso de *A. petiolaris* en ratas STZ-NA en una prueba de tolerancia a la sacarosa.
- Evaluar el efecto de *A. petiolaris* sobre la actividad de las enzimas α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* y de intestino de rata *in vitro*.

10. Hipótesis

-El extracto inhibe la absorción de glucosa a nivel intestinal provocando una disminución del pico hiperglucémico en una curva de tolerancia a la sacarosa en ratas STZ-NA.

-El extracto inhibe las enzimas α -glucosidasas de *S. cerevisiae* y de intestino de rata, en un modelo *in vitro*.

11. Justificación

La diabetes es un problema de salud en México que ha ido incrementando su incidencia de una manera acelerada, por lo que es necesario implementar estrategias de control que permitan disminuir la prevalencia, por las causas que generan su aparición.

Partiendo del conocimiento tradicional de plantas con propiedades terapéuticas, se realiza investigación para la obtención de nuevos fármacos y se ha logrado obtener información de los efectos que poseen algunas de ellas e indagaciones sobre los posibles mecanismos de acción que presentan.

En este trabajo se utilizó el extracto acuoso de *A. petiolaris*, del cual se ha comprobado que posee un efecto hipoglucemiante (Espinoza 2017), con el fin de contribuir a dilucidar su mecanismo de acción, en el presente estudio se determinará su efecto sobre la absorción intestinal de sacarosa y, adicionalmente, se analizará su efecto *in vitro* sobre la actividad de alfa glucosidasas de intestino de rata y de *Saccharomyces cerevisiae*.

12. Metodología

12.1 Preparación del material biológico

La planta *A. petiolaris* fue identificada por el Dr. José Luis Villaseñor, y se depositó un ejemplar en el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU-1333 471). Se colectó en el municipio de Tenancingo, Estado de México en febrero de 2012. El material vegetal fue proporcionado por parte del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM.

12.2 Elaboración de extracto acuoso

El extracto con rendimiento de 5.738 g., fue elaborado por la M. en C. Fernanda Artemisa Espinoza Hernández en el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se confirmó su efecto hipoglucemiante en trabajos anteriores del Dr. Andrade-Cetto y su equipo. Se tomó el extracto congelado y se liofilizó en una liofilizadora LABCONCO® para su debida administración (Espinoza, 2017).

12.3 Manejo de animales de laboratorio

Para este trabajo se utilizaron 40 ratas de la cepa Wistar, teniendo una “n” de 8 por grupo, con machos y hembras de 2 a 3 meses de edad con un peso aproximado de 250 g, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio con acceso libre a agua y alimento Rodent Laboratory Chow 5001 de purina, con periodos de luz y oscuridad controlados 12h/12h, y temperatura de 18-22°C. Cabe resaltar que todos los procedimientos fueron realizados siguiendo la NOM-062-ZOO-1999.

12.4 Inducción del modelo hiperglucémico STZ-NA

1. Con base en el modelo descrito por Masiello *et al.* (1998), las ratas en estudio presentaron un ayuno de 12 horas.

2. Se les inyectó NA con jeringa de insulina de 1 ml a una dosis de 150 mg/kg de manera intraperitoneal, disuelto en solución fisiológica.

3. Quince minutos después se inyectó STZ con una jeringa de 0.5 ml una dosis de 65 mg/kg, disuelto en buffer de acetatos 0.1 M.

4. Posteriormente se midieron los niveles de glucosa plasmática utilizando un glucómetro Accutrend Plus (Roche) para seleccionar aquellos organismos con una hiperglucemia adecuada.

12.5 Medición de glucosa plasmática

Se midió glucosa plasmática 24 horas después de la inducción, repitiendo la medición al tercer y séptimo día, para lo cual, se obtuvo una gota de sangre proveniente de la vena caudal. Posteriormente la gota se colocó en tiras reactivas Accutrend Plus glucose (Roche), las cuales se introdujeron a un glucómetro. Se seleccionaron aquellas ratas que presentaron glucosa en sangre dentro de un rango de 170 a 210 mg/dl.

Una vez seleccionada la rata dentro del rango de glucosa adecuado, se realizaron las pruebas de tolerancia a sacarosa con una duración de hora y media, midiendo glucosa cada treinta minutos, a partir de la administración del tratamiento correspondiente. Todas las medidas se tomaron por duplicado.

12.6 Grupos experimentales

Las ratas fueron separadas en 5 grupos experimentales de 8 animales cada uno: control normoglucémico (CN), control hiperglucémico (CH), control hiperglucémico con fármaco (C+), experimental con extracto de *A. petiolaris* (EAP). A todos los grupos se les administró una carga de sacarosa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Grupos experimentales y sus tratamientos

| Grupo experimental | Tratamientos |
|---|--|
| CONTROL NORMOGLUCÉMICO (CN) | Solución de sacarosa (3 g/kg) |
| CONTROL HIPERGLUCÉMICO (CH) | Solución de sacarosa (3 g/kg) |
| CONTROL HIPERGLUCÉMICO CON FÁRMACO (C+) | Acarbosa (3 mg/kg) y solución de sacarosa (3 g/kg) |
| EXPERIMENTAL CON EXTRACTO DE A. PETIOLARIS (EAP) | Extracto de <i>A. petiolaris</i> (160 mg/kg) y solución de sacarosa (3 g/kg) |

12.7 Preparación y administración de tratamientos.

Los cálculos para los diferentes tratamientos fueron elaborados con base en el peso de cada rata. Para facilitar el proceso de administración se diluyeron los tratamientos en solución fisiológica (NaCl al 0.9%). Se administró vía oral cada tratamiento por medio de una cánula esofágica.

Primero se administró el extracto (160 mg/kg) o acarbosa (3 mg/kg) y 5 minutos después se administró sacarosa (3 g/kg), a partir de ese momento se tomó el tiempo para las siguientes mediciones de glucosa, de los T30, T60, T90 minutos, tomando como T0 la medición inicial antes de administrar el tratamiento. Con base en este procedimiento se obtuvieron las curvas de glucosa.

12.8 Obtención de disacaridasas de intestino de rata y *S. cerevisiae*

Las disacaridasas de intestino de rata se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Nishioka (1998). Las enzimas de *S. cerevisiae* se obtuvieron de Sigma-Aldrich (G5003-100UN).

12.9 Ensayos enzimáticos de inhibición de α -glucosidasas

El experimento *in vitro* se realizó con base en el procedimiento descrito por Matsui (1999) con modificaciones. Se evaluó la actividad de enzimas α -glucosidasas de intestino de rata (10mg) y de *S. cerevisiae* (10mg).

La medición de la actividad de las enzimas α -glucosidasas se determinó a través de la liberación del p-nitrofenol, el cual genera una coloración amarilla con respecto al p-Nitrofenol α -D- glucopiranosido (4NPGP), disuelto en buffer de fosfatos 0.1M y pH 6.8.

Se realizaron ensayos por duplicado con diferentes concentraciones de extracto, empleando como control positivo el fármaco acarbosa.

Tanto el extracto, como la acarbosa (10mg) y las enzimas fueron disueltas en el buffer ya mencionado. A partir de esto, se hicieron las mediciones a diferentes concentraciones de extracto o de acarbosa, las cuales fueron de 0 a 1000 μ g/ml. La liberación de p-nitrofenol fue seguida en un espectrofotómetro (Beckman modelo DU640) a 405nm, durante siete minutos.

A través del Δ absorbancia/minuto se determinó la inhibición de la actividad enzimática, posteriormente se calculó la IC₅₀ por medio del método gráfico.

12.10 Estadística

Los datos fueron analizados mediante una prueba ANOVA, aplicándose un pos-hoc de Tukey, para comparar los niveles de glucosa plasmática contra el control y tiempo cero. Se tomó un nivel de significancia de una $p \leq 0.05$.

Se hizo un ANOVA de una vía con la prueba pos-hoc de Tukey, para el efecto de *A. petiolaris*. Todos los análisis anteriores se llevaron a cabo mediante GraphPad

13. Resultados

13.1 Curva de tolerancia a la sacarosa

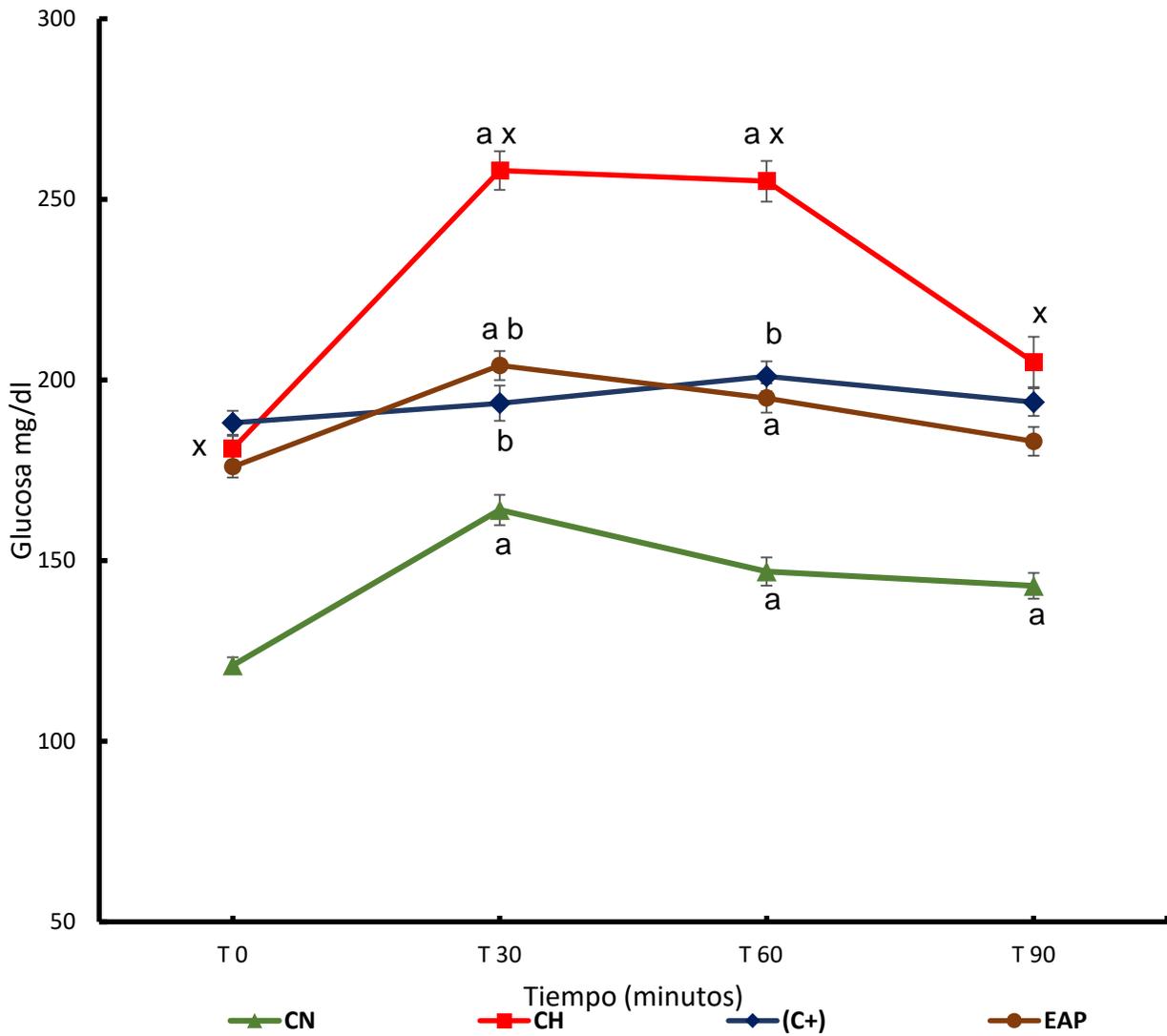
Con el objetivo de comprobar la condición hiperglucémica de las ratas utilizadas en este trabajo, se compararon los niveles de glucosa plasmática del grupo control normoglucémico con las ratas del grupo hiperglucémico, observándose diferencias significativas en todos los tiempos (0, 30, 60, 90). Los valores de glucosa en sangre de los tratamientos de acarbosa y extracto de *A. petiolaris* se muestran en el siguiente cuadro 4.

Cuadro 4. Media de valores de glucosa en una curva de tolerancia a sacarosa. Se muestra el error estándar, con una “n” de 8 por grupo y la diferencia significativa, en donde “a” representa diferencia significativa con respecto al T0, “x” representa diferencia significativa con respecto al grupo CN, “b” representa diferencia significativa con respecto al grupo CH, el grupo C+ y el grupo EAP.

| Glucosa sanguínea (mg/dl) ± (ER) | | | | |
|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Grupo/Tiempo (min.) | T 0 | T 30 | T 60 | T 90 |
| Normoglucémico (CN) | 122 ±2 | 169 ±6 ^a | 148 ±5 ^a | 147 ±5 ^a |
| Hiperglucémico (CH) | 180 ±5 ^x | 253 ±10 ^{ax} | 252 ±17 ^{ax} | 211 ±18 ^x |
| Hiperglucémico con fármaco (C+) | 191 ±4 | 204 ±7 ^b | 198 ±6 ^b | 195 ±6 |
| Extracto de <i>A. petiolaris</i> (EAP) | 179 ±6 | 210 ±5 ^{ab} | 223 ±13 ^a | 205 ±11 |

Para la observación ilustrada de los datos anteriores se realizó la gráfica 1.

Curva de tolerancia a la sacarosa



Gráfica 1. Curva de tolerancia a la sacarosa. Se muestran los datos y los valores obtenidos. En el grupo CH muestra diferencias (x) en todos los tiempos contra el grupo CN. El grupo C+ presentó diferencia (b) en tiempo 30 y 60, mientras que el grupo EAP solo presentó diferencia contra el grupo CH en el tiempo 30 (b). “a” representa diferencia significativa contra el tiempo cero.

13.2 Ensayos *in vitro* de actividad de enzimas α -glucosidasas

Para los ensayos de la actividad de enzimas α -glucosidasas de intestino de rata y de *S. cerevisiae* se calculó el IC₅₀, sin embargo, no se pudo calcular para la prueba del extracto de *A petiolaris*, ya que no inhibió lo suficiente a ninguna de las enzimas, en las gráficas 2 y 3 se muestra el porcentaje de actividad enzimática.

El porcentaje de actividad inhibitoria que presento el fármaco acarbosa en los ensayos con las dos enzimas diferentes se muestran en el cuadro 5 y 6.

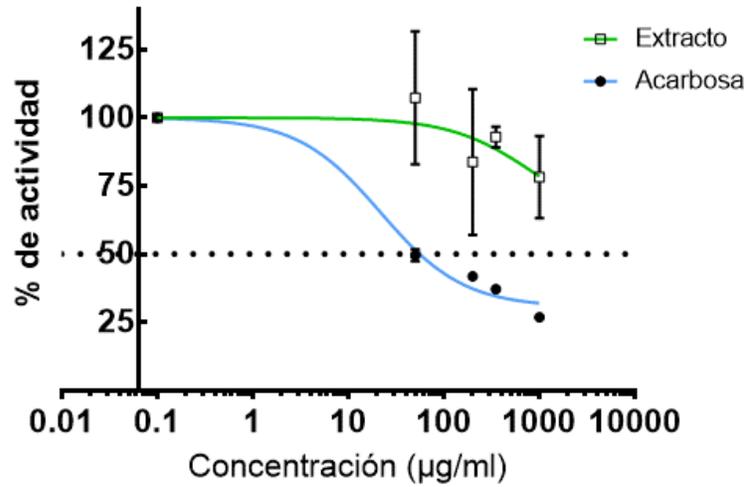
Cuadro 5. Ensayo con extracto de intestino de rata

| Inhibidor | IC ₅₀ (μ g/ml) |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Acarbosa | 21.76 |
| Extracto de <i>A petiolaris</i> | -- |

Cuadro 6. Ensayo con enzima de *S. cerevisiae*

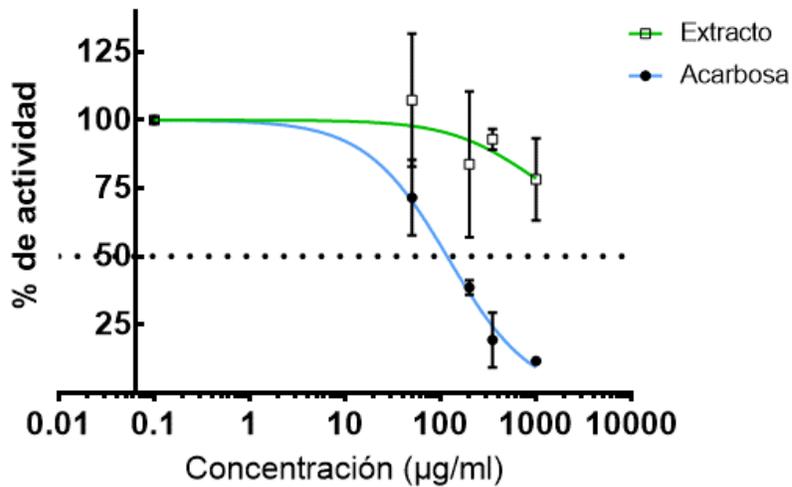
| Inhibidor | IC ₅₀ (μ g/ml) |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Acarbosa | 121.1 |
| Extracto de <i>A petiolaris</i> | -- |

Efecto del extracto en enzimas de intestino de rata.



Gráfica 2. En azul control acarbosa y en verde el extracto acuoso de *A. petiolaris*

Efecto del extracto en enzimas de *S. cerevisiae*.



Gráfica 3. En azul control acarbosa y extracto de *A. petiolaris* en verde.

Por otra parte, se realizó una Anova de una vía, comparándose los tiempos de la actividad del extracto de *A. petiolaris* por ensayo.

14. Discusión

A partir de los primeros estudios realizados de *A. petiolaris* se comprobó que esta planta utilizada en la medicina tradicional en comunidades del Estado de México, tiene efecto hipoglucemiante (Bustos-Brito *et al.*, 2016).

Con base en los resultados obtenidos en la curva de tolerancia a la sacarosa se tiene que: El grupo CN presentó diferencias significativas a partir del T0, vs T30, T60, T90 y tuvo un pico postprandial al T30; esto se debe a que las enzimas α -glucosidasas hidrolizaron la carga dada de sacarosa, para que se asimilara la glucosa y se diera el pico hiperglucémico (Jocković, 2013).

Por otra parte, el grupo CH presentó diferencia significativa del T0 vs T30 y T60 alcanzado un pico hiperglucémico en el T30; esto ocurrió porque se dio una carga de sacarosa y a que en el modelo STZ-NA se presenta una disminución de la cantidad de células β a causa de la administración del STZ, hay una menor secreción de insulina que favoreciendo en las ratas una condición de hiperglucemia. También cabe resaltar que presentó diferencia significativa contra todos los tiempos del grupo CN, lo cual indica que el modelo de hiperglucemia fue el correcto, ya que es estable y funcional para el estudio de extractos con posible efecto hipoglucemiante (Masiello *et al.* 1998).

El grupo C+ no presentó diferencia significativa en ninguno de sus tiempos vs T0, esto fue porque el fármaco acarbosa inhibió competitivamente a las enzimas α -glucosidasas encargadas de desdoblar a la sacarosa y así evitó la asimilación de glucosa (Mesa, *et al.* 2001), sin embargo, existe diferencia significativa en los tiempos T30 y T60 contra el grupo CH.

El grupo EAP presentó diferencia significativa en T30 y T60 vs T0, inhibiendo el pico hiperglucémico de manera similar al grupo C+, a la dosis ya reportada de 160mg/kg (Bustos-Brito *et al.*, 2016), también presentando diferencia significativa contra el grupo CH en el T30.

El extracto acuoso de *A. petiolaris* es un compuesto que presenta ácido clorogénico que inhibe a la enzima G6pasa, la cual evita la liberación de glucosa por parte del hígado, cabe resaltar que las ratas no estuvieron en ayuno para estudiar este mecanismo de acción, por lo tanto, no se le puede atribuir la inhibición del pico post-

prandial. También presenta L-quirositol que promueve la translocación de GLUT4 y actúa como sensibilizador de la glucosa. Parecido al efecto hipoglucemiante reportado en otros trabajos y quizá esto actuó a favor de la inhibición del pico post-prandial (Espinoza, 2017; Bustos-Brito *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2007).

En los ensayos del experimento *in vitro* para la actividad de enzimas α -glucosidasas de intestino de rata, se obtuvo una IC₅₀ de 21.76 μ g/ml para el fármaco acarbosa. Al probarse el extracto de *A. petiolaris* no se logró calcular IC₅₀ ya que los resultados presentaron mucha varianza, sin embargo, al compararse los puntos en una prueba posc-hoc de Tukey tampoco existió diferencias significativas en el ANOVA realizado.

En los ensayos de enzimas α -glucosidasas de *S. cerevisiae* se obtuvo un IC₅₀ de 121.1% μ g/ml para el fármaco acarbosa, por otra parte, el extracto de *A. petiolaris* no se logró calcular una IC₅₀, ya que de manera similar a las enzimas de intestino, la varianza fue mucha y de la misma forma los puntos analizados en el posc-hoc de Tukey en el ANOVA no presentaron diferencias significativas.

En otros estudios se ha observado una inhibición por parte de la acarbosa del 90% de actividad enzimática a una concentración de 20 μ g/ml (Andrade *et. al*, 2015), por lo que se ha demostrado que la efectividad de este inhibidor es parecida a la reportada en este trabajo.

El extracto de *A. petiolaris* no mostró inhibición en las enzimas de intestino de rata, ni de *S. cerevisiae* en el modelo *in vitro*. Esto puede deberse a un error en el ensayo debido a las variaciones de los resultados, por lo que se concluye que el mecanismo de acción no es el de inhibir a las enzimas α -glucosidasas. Los compuestos de la planta, como el ácido clorogénico y el L-quirositol, pueden estar evitando el pico post-prandial en el modelo *in vivo* mediante otro mecanismo.

Teniendo en cuenta los trabajos anteriores y los resultados del presente trabajo se puede inferir que el mecanismo principal por el cual actúa la planta es la de inhibir la gluconeogénesis por medio de la supresión de la actividad de la enzima G6pasa, generada por el ácido clorogénico; y por otro lado, el L-quirositol estaría funcionando como un sensibilizador que promueva la entrada de glucosa a tejidos

periféricos generando la translocación de GLUT4, como se ha observado en trabajos reportados por Thomas *et al.*, 2016; Yap *et al.*, 2007.

Finalmente, se consideró la posibilidad del papel biológico presente en algunas plantas con la capacidad de inhibir enzimas α -glucosidasas como defensa contra la herbívora y para su protección contra insectos (Simoni, 2014). Se sugiere realizar un estudio crónico con el extracto para observar si a largo plazo modifica los parámetros lipídicos (como triglicéridos y colesterol) y así dilucidar su posible mecanismo de acción, que puede ser el de sensibilizar los tejidos periféricos a la insulina a largo plazo o bien estar actuando de forma parecida a las incretinas.

15. Conclusión

- El extracto acuoso de *A. petiolaris* inhibió el pico hiperglucémico en el ensayo *in vivo* en una prueba de tolerancia a la sacarosa

- El extracto acuoso de *A. petiolaris* no inhibe las enzimas α -glucosidasas en el ensayo *in vitro*, tanto de *S. cerevisiae* como de intestino de rata, lo que indica que el principal mecanismo de acción hipoglicémico no es la inhibición de las enzimas α -glucosidasas intestinales.

16. Referencias

•Albuquerque U., Medeiros P., Almeida A., Monteiro J., LinsNeto E., Melo J., Santos J. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114 (3): 325-354.

•Altagracia M., Kravzov J., del Rosario M., Rubio C., Skromne D., Rivas M., Vázquez E. 2007. Diabetes mellitus tipo 2: ventas de los hipoglucemiantes orales y costos de los tratamientos farmacológicos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38 (1): 23-33.

•American Diabetes Association. 2018. Lifestyle Management: Standards of Medical Care in Diabetes 2018. *Diabetes Care*, 41 (Suppl 1) S38-S50.

•Andrade A., Cabello C., Cárdenas R. 2015. Alpha-glucosidase inhibiting activity of five mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (1): 27-32.

•Andrade A., Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 (3): 325-348.

•Andrade A., Heinrich M. 2011. From the Field into the Lab: Useful Approaches to Selecting Species Based on Local Knowledge. *Frontiers in Pharmacology*, 2: 20.

•Arias J., Balibrea J. 2007. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (2): 160-168.

•Barbosa-da-Silva, S., Bringhenti S., I., Lonzetti T. C., Souza-Mello, V., Barbosa A. M., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2014. Animal Models of Nutritional Induction of Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal Of Morphology*, 32(1), 279-293.

•Base de datos de defunciones 1990-2011. 2012. INEGI/Secretaría de Salud. Base de datos del SEED, información preliminar. DGIS/DGE.

•Bennett R., Pegg A. 1981. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Research*, 41 (7): 2786–2790.

- Berg J., Tymoczko J., Stryer F. 2007. Biochemistry. Sixth Edition. New York, USA: Capítulo 30.
- Biblioteca digital de la Medicina tradicional Mexicana. 2012. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Consultada en www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx en noviembre de 2017.
- Bolzán A., Bianchi M. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 512 (2): 121-134.
- Bono V. 1976. Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treatment Reports*, 60 (6): 699-702.
- Bradfield J., Qu H., Wang K., Zhang H., Sleiman P., Kim C., Mentch F., Qiu H., Glessner J., Thomas K., Frackelton E., Chiavacci R., Imielinski M., Monos D., Pandey R., Bakay M., Grant S., Polychronakos C., Hakonarson H. 2011. A genome-wide meta-analysis of six type 1 diabetes cohorts identifies multiple associated loci. *PLoS Genetics*, 7 (9): 1002293.
- Brito-Casillas Y., Melián C., Wägner A. M. 2016. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*. Vol. 63, Issue 7, pags. 345-353. ISSN 2173-5093
- Bustos C., Andrade A., Giraldo J., Moreno A., Quijano L. 2016. Acute hypoglycemic effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, 185: 341-346.
- Caspary, W. F. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of clinical nutrition*: 299S-308S.
- Castrejón V., Carbó R., Martínez M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Estudios Brasileños*, 26 (2): 49-57.
- Chakrabarti S., Cherian P., Sima F. 1993. The effect of acarbose on diabetes and age- related basement membrane thickening in retial capillaries of the BB/W-rat. *Diabetes research and clinical practice*, 200: 123-128.

•Cabello H., Andrade A. 2013. *Estudio del efecto anti-hiperglucemiante de cinco plantas mexicanas*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

•CONABIO. 2015. *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King H. Rob., 1970. Tomado el 27 de noviembre de 2017 de <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6047586>

•Espinoza F., Andrade A. 2017. Efecto de los extractos de la raíz de *Smilax moranensis* M. Martens y Galeotti y de la parte aérea de *ageratina petiolaris* (moc. y sessé ex dc.) R.M. King y H. Rob sobre la gluconeogénesis hepática en ratas STZ-NA (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

•GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388: 1659-1724; DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).

•González C. 1992. Prevalencia de diabetes e insuficiencia a la glucosa en una población urbana de nivel socioeconómico bajo. *Revista de Investigación Clínica*, 44: 321-328.

•Guillén N. 2002. Diabetes mellitus: cómo se manifiesta, cómo evoluciona y cómo se complica. *Ciencia*, 53: 54-62.

•Guzmán J., Lyra R., Aguilar C., Cavalcanti S., Escaño F., Tambasia M., Duarte E., ALAD grupo consenso. 2010. El tratamiento de la diabetes tipo 2 en América Latina: Con el consenso de las asociaciones médicas de 17 países de América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 28 (6): 463-471.

•Hanefeld M. 1993. Acarbose efficacy review. *Pract Diabetes Suppl*, 10: 521-527.

•Hattersley, A., Bruining, J., Shield, J., Njolstad, P., y Donaghue, K. 2006. El diagnóstico y manejo de diabetes monogénica en niños. Pautas de Consenso de Práctica Clínica ISPAD 2006-2007. *Diabetes pediátrica*, 7 (6), 352-360.

- Hernández A. 2010. Tratado de nutrición: Composición Y Calidad Nutritiva De Los Alimentos (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana.
- Hernández D., Herrera L. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *Iatreia*, 15 (3): 179-189.
- Heinrich M., Ankli A., Frei B., Weimann C., Sticher O. 1998. Medicinal plants in Mexico: Healers' consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine*, 47 (11): 1859-1871.
- Hoefsloot L., Hoogeveen M., Kroos M., Beeumen J., Reuser A., Oostra B. 1988. Primary structure and processing of lysosomal α -glucosidase: homology with the intestinal sucrase-isomaltase complex. *The EMBO journal*, 7 (6): 1697-1704.
- International Diabetes Federation. 2015. Diabetes Atlas (7^a ed.). International Diabetes Federation.
- International Diabetes Federation. 2017. Diabetes Atlas (8^a ed.). International Diabetes Federation.
- Jocković N., Fischer W., Bradsch M., Brandt W., Drägerj B. 2013. Inhibición de α -glucosidasas intestinales humanas por calystegines. *Agricultural and food Chemistry* 61: 5550-5557.
- Langman J., Rowland R. 1990. Activity of duodenal disaccharidases in relation to normal and abnormal mucosal morphology. *Journal of Clinical Pathology*, 43: 537-540.
- Licea M., Calero G., Marqarita T. 2013. Strategies for the prevention of type I diabetes mellitus. *Revista Cubana de Salud Pública*, 39 (4): 733-751.
- Masharani U., Karam J. 2005. Diabetes mellitus & Hipoglycemia. In: Tierney L. M., McPhee S. J. y Papadakis M. A. (eds.), *Current Medical Diagnosis & Treatment*. 44th ed. Mc Graw-Hill Lange Medical Books; pp. 1157-1201.
- Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M., Hillaire D., Novelli M., Ribes G. 1998. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47 (2): 224–229.

- Mesa J., Licea M., Hernández, A., Perich P. 2001. Reguladores prandiales de la glucemia. *Revista Cubana de Endocrinología*, 12 (1): 45-57.
- Moreno A. Andrade A. 2015. *Estudio del efecto hipoglucemiante de ageratina petiolaris en ratas STZ- NA (Tesis de licenciatura)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México
- Oki T., Matsui T., Osajima Y. 1999. Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (2): 550-553.
- Najera, I. Antonio, C. Álvarez Gordillo, G. D. C. 2016. Mecanismos moleculares de la obesidad y el rol de las adipocinas en las enfermedades metabólicas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 35 (2), 174-183.
- Nishioka T., Kawabata J., Aoyama Y. 1998. Baicalein, an alpha-glucosidase inhibitor from *Sculletaria baicalensis*. *Journal of Natural Products*, 61 (11): 1413-1415.
- Ogurtsova K., da Rocha J., Huang Y., Linnenkamp U., Guariguata L., Cho N., Cavan D., Shaw J., Makaroff L. 2015. IDF Diabetes Atlas: Estimates for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128: 40-50.
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J. D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N. Cavan D., Shaw J., Makaroff L. E. 2017. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice*, 128, 40-50.
- Okuyama M., Tanimoto Y., Ito T., Anzai A., Mori H., Kimura A., Matsui H. Chiba S. 2005. Purification and characterization of the hyperglycosylated extracellular α -glucosidase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 472-480.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Diabetes Nota descriptiva N°312. World Health Organization. Tomado de <http://www.diabetes.org/es/vivir-con-diabetes/tratamiento-y-cuidado/medicamentos/medicamentos-por-va-oral/qu-opciones-tengo.html>

- Pieper A., Verma A., Zhang J., Snyder S. 1999. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20 (4): 171–181.
- Rodríguez E. 2007. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioética*, 13(1): 25-40.
- Rosen, E. D., MacDougald, O. A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature reviews Molecular cell biology*. 7 (12): 885.
- Ruiz M. Giannaula C., Matrone A., Fraschini J. 1999. Tratamiento de la diabetes. Hipoglucemiantes orales. En: Ruiz M. Diabetes mellitus. 2ª ed., reimpression actualizada. Asunción: Editorial Akadia: 294-303.
- Kim Y., Wang M., Rhee H. 2004. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydrate Research*, 399 (3): 715-717.
- Kimura A. 2000. Molecular anatomy of α -glucosidase. *Trends in Glycoscience and glycotecnology*, 12: 373-380.
- Sandler S., Swenne I. 1983. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia*, 25: 444–447.
- Schein P., Loftus S. 1968. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Research*, 28: 1501–1506.
- Simoni, A. 2014. Fracionamento de extratos bioativos de *Drimys brasiliensis* Miers e identificação de compostos com atividade fitotóxica e inseticida. (Tesis de doctorado) Universidad Federal de Sao Carlos. São Paulo Brasil
- Taylor R. 1990. Alpha-glucosidase inhibitors. En: Bailey CJ, Flatt PR. New antidiabetic drugs. London:Smith-Gordon, 119-32.
- Thomas M., Mills S., Potter B. 2016. The “Other” Inositols and Their Phosphates: Synthesis, Biology, and Medicine (with Recent Advances in myo-Inositol Chemistry). *Angewandte Chemie International Edition*, 55 (5): 1614-1650.
- Uchigata Y., Yamamoto H., Kawamura A., Okamoto H. 1982. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 6084–6088.

•Wang Z., Gleichmann H. 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*, 47 (1): 50-56.

•Wilson G., Hartig P., Patton N., LeDoux S. 1988. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*, 37: 213–216.

•Xiaorui Z. 1998. Regulatory situation of herbal medicines - A world wide review. Geneva: World health organization; p. 11.

•Yamamoto H., Uchigata Y., Okamoto H. 1981. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294: 284–286.

•Yap A., Nishiumi S., Yoshida K., Ashida H. 2007. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology*, 55 (2-3): 103-108.

•Zähner D., Malaisse W. 1990. Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes research (Edinburgh, Scotland)*, 14 (3): 101-108.