



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIDIABÉTICO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *ANNONA DIVERSIFOLIA* SAFFORD”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SHARAY LÓPEZ FLORES



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

- PRESIDENTE:** **Profesor:** Rachel Mata Essayag
- VOCAL:** **Profesor:** Isabel del Carmen Rivero Cruz
- SECRETARIO:** **Profesor:** Fernando Calzada Bermejo
- 1er. SUPLENTE:** **Profesor:** Mabel Clara Fragoso Serrano
- 2° SUPLENTE:** **Profesor:** Mario Alberto Figueroa Saldívar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD MÉDICA DE INVESTIGACIÓN EN FARMACOLOGÍA, CORCE 2° PISO, CENTRO
MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS

ASESOR DEL TEMA:

DR. FERNANDO CALZADA BERMEJO

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE (S):

SHARAY LÓPEZ FLORES

(Nombre (s) y firma (s))

SITIO DE REALIZACIÓN

Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología – CORCE UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

El presente proyecto está registrado ante la UMAE Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS con número de registro: R-2012-3601-18; Financiamiento: FIS/IMSS/PROT/G12/1110.

ÍNDICE:

Página

| | |
|----------------------------|-----|
| Lista de abreviaturas..... | IV |
| Lista de esquemas..... | VI |
| Lista de figuras | VI |
| Lista de tablas..... | VI |
| Lista de gráficas..... | VII |

I INTRODUCCIÓN

| | |
|-------------------------------------|---|
| I.1 Planteamiento del problema..... | 1 |
| I.2 Objetivos | |
| I.2.1 Objetivo general..... | 1 |
| I.2.2 Objetivos particulares..... | 2 |
| I.3 Hipótesis..... | 2 |

II ANTECEDENTES

| | |
|--|----|
| II.1 Generalidades de la diabetes..... | 2 |
| II.1.1 Clasificación de la diabetes..... | 4 |
| II.2 Diabetes mellitus tipo 2..... | 6 |
| II.3 Diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 2..... | 7 |
| II.3.1 Prueba de tolerancia oral a la glucosa..... | 8 |
| II.4 Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2..... | 9 |
| II.4.1 Manejo no farmacológico..... | 11 |
| II.4.2 Tratamiento farmacológico..... | 12 |

| | |
|--|----|
| II.5 Medicina tradicional..... | 14 |
| II.6 Generalidades de <i>Annona diversifolia</i> Safford..... | 16 |
| III MATERIALES Y MÉTODOS | |
| III.1 Preparación del material vegetal de <i>A. diversifolia</i> Safford..... | 18 |
| III.2 Preparación del extracto etanólico..... | 18 |
| III.3 Fraccionamiento del extracto etanólico..... | 19 |
| III.4 Análisis cromatográfico..... | 20 |
| III.5 Animales de laboratorio..... | 20 |
| III.6 Preparación de las muestras..... | 20 |
| III.7 Evaluación del efecto del EEAd e hipoglucemiantes orales en animales sanos..... | 21 |
| III.8 Prueba de tolerancia oral a glucosa y a sacarosa..... | 21 |
| III.9 Inducción de diabetes mellitus 2..... | 22 |
| III.10 Efecto antidiabético: EEAd, fracciones, compuesto puro y acarbose..... | 22 |
| III.11 Prueba de toxicidad aguda..... | 23 |
| III.12 Análisis estadístico..... | 23 |
| IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| IV.1 Obtención del extracto etanólico..... | 23 |
| IV.2 Evaluación del efecto del EEAd e hipoglucemiantes orales en animales sanos..... | 24 |
| IV.3 Prueba de tolerancia oral a glucosa y a sacarosa en animales sanos..... | 28 |
| IV.4 Determinación del efecto antidiabético del EEAd en ratones con DM2..... | 32 |
| IV.5 Fraccionamiento biodirigido del EEAd..... | 33 |

| | |
|---|----|
| IV.6 Determinación del efecto antidiabético de las fracciones primarias..... | 34 |
| IV.7 Análisis cromatográfico..... | 35 |
| IV.8 Determinación del efecto antidiabético de rutina en ratones con DM2..... | 38 |
| IV.9 Prueba de tolerancia oral a glucosa y a sacarosa en animales sanos: | |
| efecto de rutina..... | 40 |
| IV.10 Prueba de toxicidad aguda..... | 42 |
| V CONCLUSIONES..... | 45 |
| VI BIBLIOGRAFÍA..... | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| Ac | Acuoso |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| °C | Grado celsius |
| ccf | Cromatografía en capa fina |
| ccfa | Cromatografía en capa fina analítica |
| ccfp | Cromatografía en capa fina preparativa |
| cm | Centímetros |
| DCM | Diclorometano |
| DE | Desviación estándar |
| DL ₅₀ | Dosis letal media |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DMID | Diabetes mellitus insulino dependiente |
| DMNID | Diabetes mellitus no insulino dependiente |
| DT ₅₀ | Dosis tóxica media |
| EEAd | Extracto etanólico de <i>Annona diversifolia</i> Safford |
| EROS | Especies reactivas de oxígeno |
| EtOH | Etanol |
| FAcOEtAd | Fracción de acetato de etilo de <i>Annona diversifolia</i> |
| FAcRAd | Fracción acuosa residual de <i>Annona diversifolia</i> |
| FDCMAAd | Fracción de diclorometano de <i>Annona diversifolia</i> |
| FDI | Federación Internacional de Diabetes |

| | |
|-------------------|---|
| g | Gramos |
| GPC | Guía Práctica Clínica |
| H ₂ O | Agua |
| HbA _{1c} | Hemoglobina glucosilada |
| h | Hora (s) |
| ip | Intraperitoneal |
| K ⁺ | Ión potasio |
| L | Litros |
| m | Metros |
| MeOH | Metanol |
| mL | Mililitros |
| mmol | Milimol |
| mmol/L | Milimol por litro |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PPAR _γ | Receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ |
| PTOG | Prueba de tolerancia oral a glucosa |
| PTOS | Prueba de tolerancia oral a sacarosa |
| Rf | Factor de retención |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SUR | Receptor de sulfonilureas |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Algoritmo de tratamiento para la diabetes mellitus tipo 2..... | 10 |
| Esquema 2. Fraccionamiento del EEAd..... | 19 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Árbol, hojas y fruto de <i>Annona diversifolia</i> Safford..... | 17 |
| Figura 2. Hojas de <i>Annona diversifolia</i> Safford..... | 17 |
| Figura 3. Cromatografía en capa fina preparativa de la FAcRAd..... | 36 |
| Figura 4. Cromatografía en capa fina preparativa de la FAcRAd compuestos identificados..... | 36 |
| Figura 5. Cromatografía en capa fina analítica de los productos puros 1-3 de la FAcRAd..... | 37 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes..... | 8 |
| Tabla 2. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones sanos tratados con EEAd a las diferentes dosis evaluadas..... | 24 |
| Tabla 3. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones sanos tratados con fármacos hipoglucemiantes orales y EEAd..... | 27 |
| Tabla 4. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones sanos tratados con EEAd y glucosa (PTOG)..... | 29 |
| Tabla 5. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones sanos tratados con EEAd y sacarosa (PTOS)..... | 30 |

| | |
|---|----|
| Tabla 6. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones con DM2 tratados con EEAd a dosis de 300-450 mg/kg..... | 32 |
| Tabla 7. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones con DM2 tratados con FDCMAAd, FAcOEtAd y FAcRAAd a dosis de 100 mg/kg..... | 34 |
| Tabla 8. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones con DM2 tratados con rutina a dosis de 50-150 mg/kg y con acarbosa..... | 38 |
| Tabla 9. Niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones sanos tratados con rutina y glucosa (PTOG) | 40 |
| Tabla 10. Variación del peso corporal (g) de los ratones sanos en prueba de toxicidad aguda tratados con EEAd..... | 42 |
| Tabla 11. Variación de peso (g) de los órganos analizados en prueba de toxicidad aguda..... | 43 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con EEAd a dosis de 300-1200 mg/kg, al tiempo dos horas..... | 25 |
| Gráfica 2. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con EEAd a dosis de 300-1200 mg/kg, al tiempo cuatro horas..... | 25 |
| Gráfica 3. Curva dosis-respuesta de ratones sanos tratados con EEAd a dosis de 300-1200 mg/kg..... | 26 |
| Gráfica 4. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con fármacos hipoglucemiantes orales y EEAd..... | 28 |

| | |
|---|----|
| Gráfica 5. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con EEAd y glucosa (PTOG)..... | 29 |
| Gráfica 6. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con EEAd y sacarosa (PTOS)..... | 31 |
| Gráfica 7. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con EEAd a dosis de 300-450 mg/kg..... | 33 |
| Gráfica 8. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con FDCMAd, FAcOEtAd y FAcRAd a dosis de 100 mg/kg..... | 35 |
| Gráfica 9. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con rutina a dosis de 50-150 mg/kg y con acarbosa..... | 39 |
| Gráfica 10. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con rutina y con glucosa (PTOG) | 41 |
| Gráfica 11. Variación de peso de los órganos analizados en prueba de toxicidad aguda..... | 43 |

I. INTRODUCCIÓN

I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el desarrollo de esta tesis se tomaron en cuenta los siguientes aspectos:

a) La *Annona cherimola* Mill., la *Annona glabra* L. y la *Annona muricata* L. son tres especies de la familia Annonaceae que se emplean en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de la diabetes mellitus (DM), y de las cuales se han demostrado científicamente sus propiedades como agentes antidiabéticos (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

b) La DM es un grave problema de salud pública en México y el mundo, con un tratamiento farmacológico de costo elevado, que además produce efectos secundarios no deseables.

c) La *Annona diversifolia* Safford es una especie vegetal de la familia Annonaceae que no es usada en la medicina tradicional mexicana como agente antidiabético; sin embargo, se han demostrado sus propiedades hipoglucemiantes en animales sanos (Brindis et al., 2013).

Por lo anterior y considerando el criterio quimiotaxonómico, la especie vegetal *Annona diversifolia* Safford, fue seleccionada para realizar su estudio fitoquímico biodirigido en un modelo *in vivo* de DM tipo 2; para aportar evidencias adicionales que permitan proponer a esta especie vegetal como otro agente con propiedades antidiabéticas en la medicina tradicional mexicana.

I.2 OBJETIVOS

I.2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antidiabética de los productos obtenidos del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Safford.

I.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la toxicidad aguda del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Safford en ratones sanos.
- Determinar el efecto de los productos obtenidos del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Safford en ratones sanos y en ratones diabéticos.

I.3 HIPÓTESIS

Con base en consideraciones de tipo quimiotaxonómico se propone que los productos (extracto, fracciones y al menos un compuesto puro) obtenidos del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Safford tienen efecto antidiabético en ratones hembra de la cepa Balb-c con diabetes mellitus.

II. ANTECEDENTES

II. 1 Generalidades de la Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es probablemente una de las enfermedades más conocidas por el hombre (Olokoba et al., 2012). El término diabetes mellitus refleja el hecho de que la orina del afectado tiene un sabor dulce (utilizado por primera vez por el médico griego Areteo). Sin embargo, fue hasta 1776, que Mateo Dobson mide realmente la concentración de glucosa en la orina de pacientes y encontró que estaba incrementada. La diabetes fue diagnosticada como una enfermedad en 1812; que debido a la falta de tratamientos efectivos, resultaba ser una enfermedad fatal (Polonsky, 2012).

El término diabetes mellitus (DM) se refiere a un conjunto de enfermedades sistémicas, crónico-degenerativas, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracterizan por

una hiperglucemia crónica debida a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. La diabetes refleja profundos cambios en el equilibrio negativo de nitrógeno y pérdida de nitrógeno de la mayoría de los órganos. La producción incrementada de nitrógeno ureico en la DM puede ser representada por el catabolismo aumentado de proteínas plasmáticas y hepáticas (Kaleem et al., 2008). La gran mayoría de los pacientes con diabetes tienen sobrepeso y presentan una combinación de resistencia a la insulina y una secreción de insulina deteriorada (Polonsky, 2012). La glucosa no puede penetrar en las células del cuerpo y utilizarse eficazmente. Se produce entonces un desbalance entre la elaboración de especies reactivas de oxígeno (EROS) y la capacidad de defensa antioxidante del cuerpo; este desbalance se conoce como estrés oxidativo. El cual ocasiona una degeneración de las paredes celulares y de los vasos sanguíneos, daños en la retina, deterioro renal, aterosclerosis, afecciones en el sistema nervioso central (SNC) e incluso múltiples alteraciones reproductivas (Murillo et al., 2006). Es la primera causa de ceguera, de insuficiencia renal crónica y de amputación no traumática de miembros inferiores (GPC, 2008).

La DM es un padecimiento complejo que lleva implícito una serie de situaciones que comprometen el control en los pacientes, lo cual favorece el desarrollo de complicaciones, con los consecuentes trastornos en la calidad de vida, muertes prematuras e incremento en los costos de atención y tasas de hospitalización. El descontrol metabólico y las consecuentes complicaciones se agravan cuando no se realiza una eficiente y oportuna detección y seguimiento de grupos con factores de riesgo (NOM, 2010). El diabético muere, fundamentalmente, por sus problemas cardiovasculares, centrados, sobre todo, en tres procesos, el infarto agudo al miocardio, el accidente vascular cerebral y la isquemia de

extremidades inferiores que desemboca en gangrena y frecuente infección grave (Tébar y Escobar, 2009).

La prevalencia de la DM ha ido aumentando de manera dramática, sobre todo en las últimas tres o cuatro décadas, resultando en una epidemia mundial que ha hecho de ésta una de las condiciones médicas más comunes y más graves que la humanidad ha tenido que enfrentar (Polonsky, 2012). Actualmente 383 millones de personas tienen DM. En 2035 el número aumentará hasta 592 millones. La DM causó 5.1 millones de muertes en 2013, cada 6 segundos muere una persona debido a la DM; 175 millones de personas con DM están sin diagnosticar. El 80% de las personas con diabetes viven en países de ingresos medios y bajos (FID, 2013).

En México durante 2011, 70 de cada 100 mil personas murieron por DM. Las defunciones por DM se concentran en la de tipo 2. En 2011 representaron 62% en mujeres y 61% en hombres (INEGI, 2013).

II.1.1 Clasificación de la diabetes

La diabetes mellitus se clasifica en cuatro tipos principales:

- Diabetes tipo 1: también denominada diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), en la cual existe destrucción de las células beta del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, casi siempre delgados y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad.
- Diabetes tipo 2: también denominada diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), en la que se presenta resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en su producción, puede ser absoluta o relativa. Los pacientes suelen ser

mayores de 30 años cuando se hace el diagnóstico, son obesos y presentan relativamente pocos síntomas clásicos.

- Diabetes gestacional: es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, ésta traduce una insuficiente adaptación a la insulino resistencia que se produce en el gestante. También se trata de resistencia a la insulina. Durante el embarazo el organismo sufre cambios hormonales muy intensos y en la diabetes gestacional estas hormonas producen el efecto inverso a la insulina, elevando la glucosa en sangre. La mayoría de las veces esta condición desaparece al finalizar el embarazo, pero existen casos en que la diabetes permanece al no llevar los cuidados adecuados durante la gestación y se considera como DM tipo 2.

- Otros tipos específicos de diabetes:

- Defectos genéticos en la función de las células beta.
- Defectos genéticos en la acción de la insulina.
- Enfermedades del páncreas exocrino.
- Endocrinopatías.
- Diabetes inducida químicamente, o por drogas.
- Infecciones.
- Diabetes poco común mediada inmunitariamente.
- Otros síndromes genéticos, algunas veces asociados con diabetes (NOM, 2010).

En este sentido, el presente trabajo está dirigido al estudio de la planta *Annona diversifolia* Safford en un modelo de DM2, por lo que a continuación se dará información adicional sobre este tipo de diabetes.

II.2 Diabetes mellitus tipo 2

La DM tipo 2 es el resultado de una deficiencia de insulina (Gardner y Shoback, 2012). Se asocia a un aumento de la concentración plasmática de insulina (hiperinsulinemia), que es la respuesta compensadora de las células beta del páncreas a la disminución de la sensibilidad de los tejidos efectores a los efectos metabólicos de la insulina, fenómeno conocido como resistencia a la insulina (Guyton y Hall, 2011).

Los pacientes con diabetes tipo 2 incluyen desde aquéllos con una grave resistencia a la insulina y mínimos defectos en la secreción de la misma, hasta aquéllos con un defecto primario en la liberación de dicha hormona. Por lo regular, estos pacientes son adultos con algún grado de obesidad, aunque las crecientes tasas de obesidad conducen a un inicio más temprano de la enfermedad en adolescentes y niños (Gardner y Shoback, 2012).

En la DM2 se describe un estado previo de intolerancia a la glucosa y de glucemia basal alterada, estados que confirman que el riesgo de desarrollar DM2 aumenta cuanto mayor es el nivel de glucemia (Tébar y Escobar, 2009).

Con frecuencia cursa sin un diagnóstico durante muchos años porque la hiperglucemia puede presentarse de manera gradual y sin síntomas iniciales. Los individuos con DM2 padecen de una disminución progresiva en la capacidad de funcionamiento de sus células beta, lo que conduce a un empeoramiento paulatino de la hiperglucemia. La presentación inicial puede deberse a complicaciones como alteraciones visuales ocasionadas por retinopatía o dolores o infecciones del pie que se deben a neuropatía periférica. Los individuos se encuentran muy deshidratados, hipotensos, letárgicos o comatosos. Las infecciones cutáneas crónicas son comunes. Con frecuencia, el prurito generalizado y las señales de candidiasis vaginal son los síntomas iniciales de las mujeres que padecen diabetes tipo 2. Los varones quizá informen de una erupción prurítica en el prepucio. Los

pacientes con una deficiencia insulínica más grave tendrán los síntomas clásicos de poliuria, sed, visión borrosa, parestesias y fatiga (Gardner y Shoback, 2012).

La hiperglucemia posprandial es importante en el desarrollo de la enfermedad; que se asocia con complicaciones micro y macrovasculares, y se ha propuesto como un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular (Brindis et al., 2013). El efecto esencial de la ausencia de insulina o de la resistencia a la misma sobre el metabolismo de la glucosa consiste en que las células, con excepción de las del encéfalo, no absorben ni utilizan de modo eficiente la glucosa. El resultado es un incremento de la glucemia, un descenso progresivo de la utilización celular de glucosa y un aumento de la utilización de las grasas y de las proteínas (Guyton y Hall, 2011).

La DM2 ha sido asociada con un incrementado riesgo de desarrollar aterosclerosis prematura debido al incremento en los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad, y un decremento en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (Adewole y Ojewole, 2009).

Los marcadores de riesgo de la DM2 son: edad avanzada, obesidad, historia familiar de diabetes, raza, nivel socioeconómico y estilo de vida (dieta e inactividad física) (Tébar y Escobar, 2009).

II.3 Diagnóstico de la Diabetes mellitus tipo 2

El diagnóstico se debe establecer cuando ocurran síntomas de diabetes como son: polidipsia, poliuria, polifagia y baja de peso, acompañado del resultado de una hiperglucemia en cualquier momento del día ≥ 200 mg/dL. Los síntomas de la diabetes en adultos mayores son inespecíficos y de aparición tardía, entre los cuales se han documentado: fatiga, letargia, somnolencia, pérdida de peso, incontinencia urinaria, pérdidas del plano de sustentación,

síntomas genitourinarios y alteraciones del estado de conciencia (GPC IMSS, 2012).

El rango de glucosa basal en plasma o suero normal es de 70 a 100 mg/dL. Un nivel de glucosa plasmática de 126 mg/dL o mayor, en más de una ocasión, después de un ayuno de al menos ocho horas, es diagnóstico de diabetes mellitus. En la tabla 1 se muestran los criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus (Gardner y Shoback, 2012).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes:

| | Tolerancia normal a la glucosa | Prediabetes | Diabetes mellitus^a |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Glucosa plasmática en ayunas (mg/dL) ^b | < 100 | 100-125 (glucosa basal alterada) | ≥ 126 |
| 2 horas después de carga de glucosa (mg/dL) ^c | < 140 | ≥ 140-199 (intolerancia a la glucosa) | ≥ 200 |
| HbA _{1c} (%) ^a | < 5.7 | 5.7-6.4 | ≥ 6.5 |
| Síntomas y concentración de glucosa al azar (mg/dL) | --- | --- | ≥ 200 |

^aLa glucosa plasmática en ayunas o HbA_{1c} (hemoglobina glucosilada) son diagnósticas de diabetes si se confirman en pruebas repetidas.

^bLa glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL es diagnóstica de diabetes si se confirma en algún día subsiguiente al que se encuentra en rango diabético después de ayuno nocturno.

^cAntes de la prueba, administre 75 g de glucosa disuelta en 300 mL de agua después de ayuno nocturno en pacientes que recibieron al menos 150 a 200 g de carbohidratos a diario por tres días. En ausencia de una hiperglucemia inequívoca, el resultado debe confirmarse mediante pruebas repetidas (Gardner y Shoback, 2012).

II.3.1 Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG)

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se lleva a cabo para propósitos de investigación o cuando se sospecha el diagnóstico de DM, pero la glucemia en ayunas es inferior a 126 mg/dL o el nivel de HbA_{1c} se encuentra por debajo de 6.5%. A los adultos se les proporcionan 75 g de glucosa en 300 mL de agua; a los niños 1.75 g de glucosa por kilogramo de su peso corporal ideal. La carga de glucosa debe consumirse en un periodo no mayor de 5 minutos. Se obtienen muestras para la glucosa en plasma en ayuno y 120 minutos después de ingerir la glucosa. Un valor de glucemia en ayunas de 126 mg/dL (7 mmol/L) o mayor, o uno

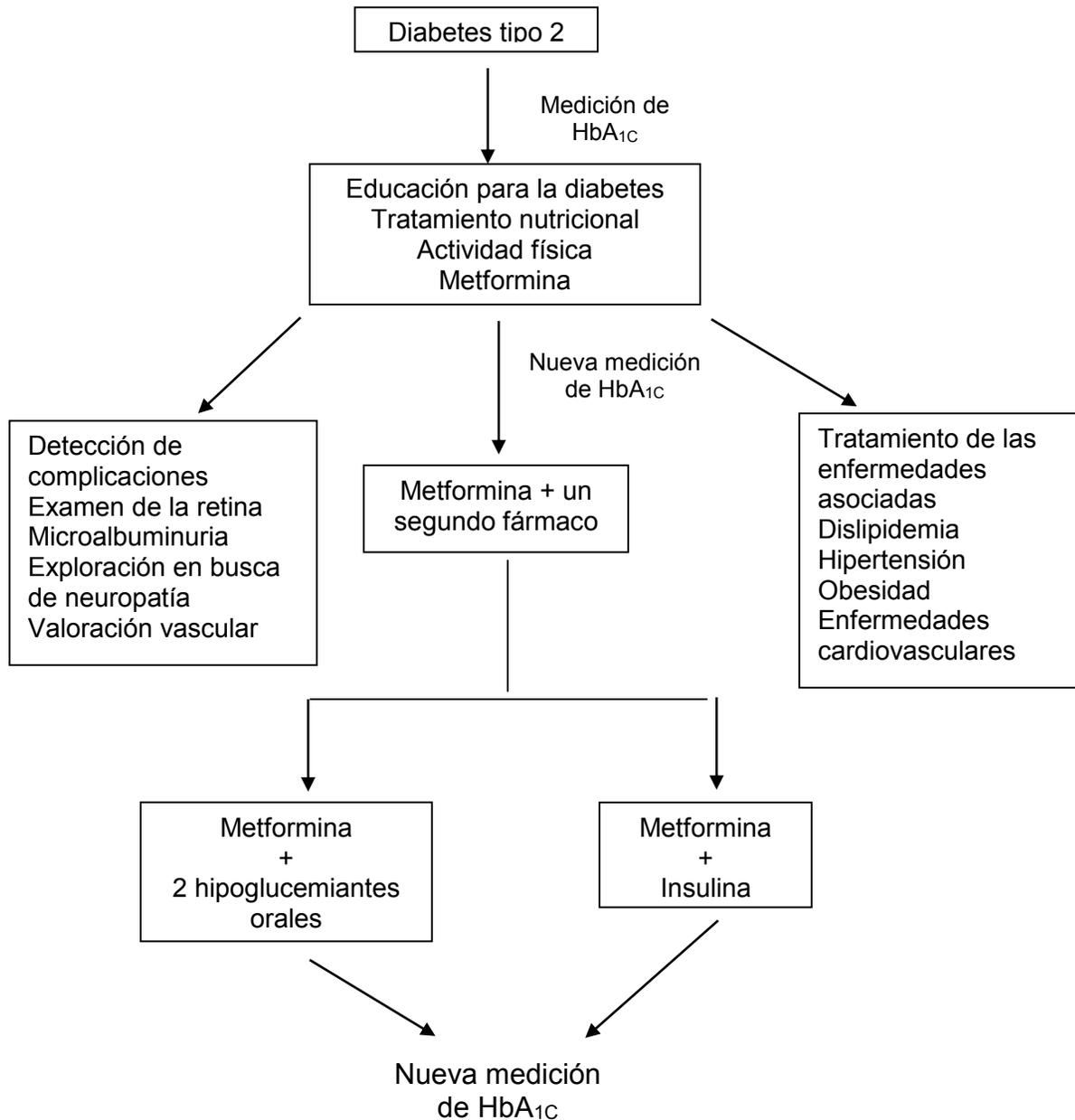
superior a los 200 mg/dL poscarga de glucosa (11.1 mmol/L) es diagnóstico de DM. Una prueba de tolerancia a la glucosa es normal si el valor de glucosa plasmática venosa en ayunas es inferior a los 100 mg/dL (5.6 mmol/L), y si el valor de 2 horas poscarga de glucosa se encuentra por debajo de los 140 mg/dL (7.8 mmol/L). Los pacientes con valores de 2 horas poscarga de glucosa entre 140 y 199 mg/dL tienen intolerancia a la glucosa. Pueden presentarse resultados falsos positivos en pacientes desnutridos al momento de la prueba, en aquéllos postrados en cama o los que padecen de alguna infección o de estrés emocional grave. Los diuréticos, anticonceptivos orales, glucocorticoides, tiroxina excesiva, fenitoína, ácido nicotínico y algunos fármacos psicotrópicos también pueden arrojar resultados falsos positivos (Gardner y Shoback, 2012).

II.4 Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2

El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones (NOM, 2010).

1. Control de la glucemia: modificaciones en la dieta y en el estilo de vida, ejercicio y medicamentos.
2. Tratamiento de las enfermedades asociadas: dislipidemia, hipertensión, obesidad y enfermedades cardiovasculares
3. Detección y tratamiento de las complicaciones de la diabetes: retinopatía, enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía y otras complicaciones (Brunton et al., 2012).

Se dispone de varias formas o combinaciones farmacológicas que se utilizan para el tratamiento de la DM2, por medio de algoritmos como el siguiente (Brunton et al., 2012).



Esquema 1. Algoritmo de tratamiento para la diabetes mellitus tipo 2.

La mayor parte de los pacientes con diagnóstico reciente con DM2 tienen diabetes subclínica o no diagnosticada muchos años antes y deben ser valorados en busca de complicaciones de la diabetes. La incapacidad para alcanzar cifras ideales de glucosa, por lo general con concentraciones de $HbA_{1c} \leq 6.5\%$ en tres meses, debe ser indicación para añadir un segundo hipoglucemiante oral (Brunton et al., 2012).

II.4.1 Manejo no farmacológico

Es la base para el tratamiento en pacientes con prediabetes y diabetes, consiste en un plan de alimentación, control de peso y actividad física apoyado en un programa estructurado de educación terapéutica (NOM, 2010).

La dieta se dirige a perder peso, disminuir la presión arterial y el riesgo de aterosclerosis. El ejercicio proporciona múltiples beneficios para pacientes con diabetes, pero la dosificación del tratamiento hipoglucemiante puede requerir ajuste para evitar la hipoglucemia relacionada con el ejercicio (Brunton et al., 2012).

Estudios han mostrado que hay una reducción significativa en la incidencia de DM tipo 2 con una combinación de: mantenimiento del índice de masa corporal de 25 kg/m^2 , consumiendo comida alta en fibra y grasas insaturadas y baja en grasas trans y saturadas, haciendo ejercicio regularmente y, absteniéndose del consumo de cigarro y alcohol. Lo cual sugiere que la DM tipo 2 puede prevenirse mayormente, por modificaciones en el estilo de vida (Olokoba et al., 2012).

II.4.2 Tratamiento farmacológico

Hipoglucemiantes orales: sólo pueden prescribirse a pacientes con DM tipo 2.

Los fármacos disponibles son:

- Sulfonilureas (glibenclamida, glimepirida, etc.): ejercen su efecto estimulante sobre la secreción de insulina mediante su unión a un receptor de la membrana, denominado receptor de sulfonilureas (SUR), bloqueando los canales de K^+ dependientes de ATP en las células beta y estimulando los efectos que la glucosa induce sobre la secreción de insulina (Velázquez, 2008). La hipoglucemia que pueden causar podría llegar al coma. Efectos secundarios menos frecuentes incluyen náusea y vómito, ictericia colestásica, agranulocitosis, anemia aplásica y hemolítica, reacciones de hipersensibilidad generalizada y reacciones dermatológicas (Goodman y Gilman, 2012).
- Análogos de metiglinidas (repaglinida): al igual que las sulfonilureas se fijan a la subunidad SUR1 del canal de K^+ dependiente de ATP en las células beta del páncreas y promueven la liberación de insulina. Esta acción, a diferencia de lo que ocurre con las sulfonilureas, es estrictamente dependiente de la presencia de glucosa. Evitan la hiperglucemia postprandial. Pueden producir algunas molestias gastrointestinales moderadas y, rara vez, reacciones de hipersensibilidad. También pueden incrementar el peso de los pacientes (Flórez, 2008).
- Biguanidas (metformina): suprimen la producción de glucosa hepática, incrementan la sensibilidad a insulina, favorecen la captación periférica de glucosa en el músculo estriado, disminuyen la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal, incrementan la oxidación de ácidos grasos e inhiben la gluconeogénesis hepática. Por su efecto anorexígeno, son útiles en pacientes obesos. Suelen asociarse a otros

hipoglucemiantes (sulfonilureas) (Velázquez, 2008; Olokoba et al., 2012). Las reacciones adversas más frecuentes son las gastrointestinales (anorexia, náuseas, molestias abdominales y diarrea). La reacción más grave, aunque infrecuente, es la acidosis láctica (Flórez, 2008).

- Inhibidores de las alfa-glucosidasas (acarbosea y miglitol): impiden la absorción intestinal de hidratos de carbono complejos, reduciendo la hiperglucemia postprandial. Tienen efectos secundarios indeseables tales como distensión abdominal, flatulencia, meteorismo y diarrea; y en caso de hipoglucemia, hay que administrar glucosa (Velázquez, 2008).
- Glitazonas o tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona): se comportan como agonistas del PPAR γ (receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ). Incrementan la captación periférica de glucosa y sensibilizan los tejidos a la acción de insulina. En consecuencia, disminuyen las concentraciones de glucemia, de insulina y de HbA_{1c}, sin llegar a producir hipoglucemia. Se utilizan como tratamiento coadyuvante, asociados a sulfonilureas o metformina. Las reacciones adversas más frecuentes son la retención de líquido con formación de edemas, por expansión del volumen vascular. Producen también anemia, con reducción de los niveles de hemoglobina, y aumento de peso (Velázquez, 2008; Flórez, 2008).

La hipoglucemia es el riesgo principal del tratamiento con hipoglucemiantes orales. Existen diversas respuestas fisiológicas a la hipoglucemia. La primera respuesta consiste en la reducción de la secreción de insulina endógena, que ocurre con concentraciones plasmáticas de alrededor de 70 mg/dL (3.9 mmol); más tarde se liberan hormonas contra reguladoras: adrenalina, glucagón, hormona del crecimiento, cortisol y noradrenalina. Los síntomas de

hipoglucemia se detectan por primera vez con concentraciones plasmáticas de glucosa de 60 a 80 mg/dL (3.3-4.4 mmol). Los primeros síntomas incluyen diaforesis, sensación de hambre, parestesias, palpitaciones, temblor y ansiedad, principalmente de origen autonómico. La dificultad para concentrarse, confusión, debilidad, somnolencia, sensación de calor, mareo, visión borrosa y pérdida de la conciencia (los síntomas más importantes de la neuroglucopenia) por lo general ocurren con concentraciones plasmáticas de glucosa inferiores a las necesarias para que aparezcan los síntomas del sistema nervioso autónomo. La ausencia de glucagón y adrenalina puede ocasionar hipoglucemia prolongada, en particular durante la noche, cuando algunos individuos pueden tener concentraciones plasmáticas de glucosa extremadamente bajas por varias horas. La hipoglucemia grave puede ocasionar convulsiones y coma. La hipoglucemia leve a moderada puede tratarse con la simplificación de glucosa (15 g de carbohidratos). Cuando la hipoglucemia es grave, debe tratarse con la administración de glucosa intravenosa o con la inyección de glucagón (Brunton et al., 2012).

Por lo anterior, las plantas medicinales son una alternativa en el manejo de la DM, ya que la insulina y los fármacos hipoglucemiantes orales tienen efectos secundarios indeseables. El manejo de la DM sin cualquier efecto secundario aún es un desafío para el sistema médico. Por lo tanto, la búsqueda de un fármaco con bajo costo, mayor potencia y sin efectos secundarios adversos es una necesidad mundial (Adeyemi et al., 2009; Kaleem et al., 2008).

II.5 Medicina tradicional

La medicina tradicional comprende diversas prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias que incorporan medicinas procedentes de plantas, animales y/o fuentes minerales, técnicas manuales y ejercicios, aplicados en singular o en combinación para mantener el

bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades (OMS, 2002).

Las poblaciones de África, Asia y Latinoamérica utilizan la medicina tradicional para ayudar a satisfacer sus necesidades sanitarias primarias, al ser accesible y asequible económicamente. La preocupación sobre los efectos adversos de los fármacos, un deseo de una atención sanitaria más personalizada y un mayor acceso a la información sanitaria, estimulan este mayor uso. Por consiguiente, se está utilizando cada vez más para un amplio espectro de enfermedades tanto por personas de países desarrollados como de países en desarrollo. Lo que ha creado retos en el sector de salud desde el punto de vista de seguridad, eficacia y calidad, acceso y uso racional; por ello se busca respaldar la investigación en el tratamiento seguro y eficaz de aquellas enfermedades que representan el mayor peso sanitario, en especial para las poblaciones más pobres (OMS, 2002).

Las plantas medicinales han suscitado el interés científico, especialmente en estas tres últimas décadas, al ser una fuente de interés en el hallazgo de nuevas moléculas y principios activos derivados de ellas. Gracias a la aparición de métodos de análisis cualitativos y cuantitativos precisos, sumados a la incorporación de las baterías de ensayos *in vitro* o modelos animales que en otros tiempos estaban destinados únicamente a los fármacos de síntesis, las plantas medicinales han reivindicado su potencial farmacológico y lo han puesto al servicio de la salud. Asimismo, muchas moléculas aisladas a partir de las plantas han servido de precursores o prototipos para la elaboración de fármacos de síntesis: *Agave americana* (síntesis de hormonas esteroideas), *Vicia faba* (obtención de L-Dopa), *Salix alba* y *Filipendula ulmaria* (síntesis de ácido acetil-salicílico) son algunos ejemplos (Berdonces, 2009).

Es necesario llevar a cabo más trabajo a fin de elevar la conciencia sobre la seguridad y el uso apropiado de la MT (OMS, 2002). Muchos remedios herbales tienen efectos terapéuticos

reconocidos; pero también pueden tener efectos secundarios desconocidos (Adewole y Ojewole, 2009).

En México alrededor de 4 000 especies de plantas (aproximadamente 15% de la flora total) tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en un 5% de estas especies. Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron una de las herbolarias más complejas del mundo, debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron; así pues, desde tiempos prehispánicos diferentes grupos étnicos han usado plantas con fines medicinales (Ocegueda et al., 2005).

II.6 Generalidades de *Annona diversifolia* Safford

Annona diversifolia Safford (sinonimia: *Annona macrophyllata*) es una especie perteneciente a la familia *Annonaceae*, la cual consiste de 2300 a 2500 especies incluidas en más de 130 géneros. *Annona diversifolia* es un árbol conocido como “ilama” en el centro de México (Estados de Colima, Guerrero y México); mientras que en el sureste (región de Tehuantepec y Yucatán) es designado como “papauce” o “anona blanca” (Brindis et al., 2013).



Figura 1. Árbol, hojas y fruto de *Annona diversifolia* Safford.



Figura 2. Hojas de *Annona diversifolia* Safford.

Las plantas de la familia *Annonaceae* son consideradas como cultivos de importancia económica en todo el mundo. *A. diversifolia* es una fruta nativa del sureste de México, Guatemala y El Salvador, y es considerada como uno de los frutos subtropicales más

importantes de los lugares de clima cálido. El árbol puede llegar a medir hasta 8.5 m de altura. El tronco usualmente es no mayor a 25 cm de grosor, a veces derivan del suelo para formar de tres a seis tallos principales. Es una especie subcaducifolia y endémica de la cuenca del río Balsas. La planta requiere de un clima cálido, con temperaturas entre los 24 y 37°C y con una estación seca y húmeda. La fruta tiene forma oval, con especímenes mayores con un peso de 500 a 900 g. Cada árbol produce un promedio de 50 frutas (Julián et al., 2011; Cruz, 2002).

Los frutos de *A. diversifolia* se utilizan como alimento, sus hojas se emplean como anticonvulsivos, así como agentes analgésicos y antiinflamatorios en la medicina tradicional mexicana. Como antidiarreico (el fruto verde), anticatarral (las hojas jóvenes), para tratar luxaciones (la corteza asada) y como antiinflamatorio (las hojas) (Brindis et al., 2013; Luna y González, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DE *Annona diversifolia* Safford

Se utilizaron hojas de la especie vegetal *A. diversifolia* Safford, las cuales se recolectaron en Veracruz por el médico Edwin Cruz. La identificación se llevó a cabo en el Herbario de Plantas Medicinales del IMSS (Herbario IMSS), por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras. Se depositó el ejemplar de herbario con un número de registro 16099.

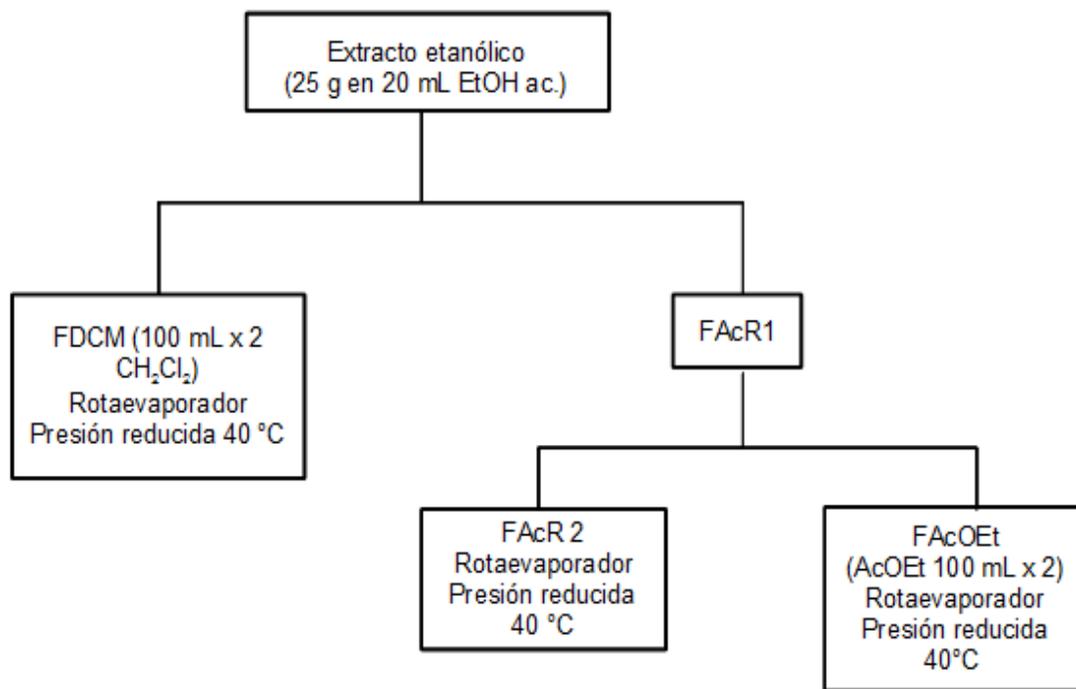
III.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

La obtención del extracto etanólico de las hojas de *A. diversifolia* Safford (EEAd) se realizó según los métodos previamente descritos (Calzada et al., 2003; Velázquez et al., 2006) en los que las hojas de la planta se secaron al aire a temperatura ambiente durante 7 días,

obteniéndose 505 g de hojas secas que se pulverizaron con un molino Tor-Rey. Posteriormente se extrajeron por maceración en etanol acuoso (6.5 L x 2 semanas) a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y se concentró a sequedad usando un rotaevaporador a presión reducida, obteniéndose 47.81 g de extracto verde oscuro y de consistencia pastosa. El EEA_d seco se almacenó en refrigeración hasta su posterior uso.

III.3. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

25 g del EEA_d obtenido se resuspendieron en EtOH al 10% en agua (20 mL) y se fraccionaron por par de disolventes no miscibles utilizando DCM (100 mL x 2) y AcOEt (100 mL x 2). Ver esquema 2.



Esquema 2. Fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Safford.

III.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

La cromatografía en capa fina (ccf) tanto preparativa como analítica, se realizó de acuerdo a las técnicas convencionales, empleando placas de aluminio (Cromatofolios en aluminio TLC 20 X 20 cm sílica gel 60 F₂₅₄ y cromatoplasmas de vidrio TLC 20 X 20 cm sílica gel 60 F₂₅₄) y un sistema de elución AcOEt/ MeOH/ H₂O (10 mL/ 1.6 mL/ 1.3 mL).

III.5. ANIMALES DE LABORATORIO

Se usaron ratones hembra de la cepa Balb-c del bioterio del CMN SXXI IMSS, los cuales se dividieron en grupos de 6 animales cada uno; con pesos de 17 ± 2.6 g para las pruebas de tolerancia oral a glucosa y sacarosa y de 20 ± 3.2 g para el resto de las pruebas. Se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio con ciclos de luz/oscuridad 12/12 h, temperatura controlada y con libre acceso al agua y alimento, según la NOM 062-ZOO-1999. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Local de Investigación del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI IMSS, con número de registro: R-2012-3601-18.

III.6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Todas las muestras: EEAd (dosis 30, 300, 375, 450, 600, 900, 1200 y 3000 mg/kg), fracciones (100 mg/kg), compuesto puro (50, 100 y 150 mg/kg), hipoglucemiantes orales (metformina 850 mg/kg, glibenclamida 5 mg/kg y acarbosa 50 mg/kg), glucosa (1.5 g/kg) y sacarosa (3 g/kg), se solubilizaron en agua 1 mL por animal. Se administraron vía intragástrica por medio de una sonda esofágica, y la dosis se ajustó de acuerdo al peso de los animales.

III.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EEAd E HIPOGLUCEMIANTES ORALES EN ANIMALES SANOS

Se usaron 9 grupos de ratones hembra sanas, el grupo 1 fue tratado con 1 mL del vehículo usado como control, los grupos 2 al 6 fueron tratados con el EEAd en dosis crecientes de 300, 450, 600, 900 y 1200 mg/kg. Los grupos 7 al 9 fueron tratados con los fármacos: metformina (850 mg/kg), glibenclamida (5 mg/kg) y acarbosa (50 mg/kg).

Los niveles de glucemia sanguínea se determinaron con ayuda de un glucómetro Evolution (Infopia USA, LLC y tiras reactivas para glucómetro Evolution). Las muestras de sangre se tomaron de la vena caudal por medio de una pequeña incisión al final de la cola. Se analizó el efecto a las 2 y 4 horas después de administrarse el tratamiento, el tiempo cero se evaluó como un control interno. Durante esas 4 horas, los ratones solamente tuvieron libre acceso al agua.

En el presente trabajo se entenderá por efecto hipoglucemiante de una sustancia, a la disminución de los niveles de glucosa en sangre por debajo de los valores normales (control sano). Y por efecto antihiperoglucemiante, a la disminución de los niveles de glucosa en sangre por debajo de los valores de un diabético (control diabético).

III.8. PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A GLUCOSA Y A SACAROSA

Se usaron 7 grupos de ratones hembra sanas con 24 horas de ayuno previo, a los grupos 1 al 3 se les administró 1 mL del vehículo, a los grupos 4 y 5 una dosis de 450 mg/kg del EEAd y a los grupos 6 y 7 una dosis de 100 mg/kg del flavonoide rutina en el tiempo cero. Treinta minutos después los grupos 2, 4 y 6 fueron tratados con una dosis de 1.5 g/kg de glucosa; y los grupos 3, 5 y 7 con una dosis de 3.0 g/kg de sacarosa. Se midieron los niveles de glucosa en sangre a las 0, 2 y 4 horas.

III.9. INDUCCIÓN DE DIABETES MELLITUS 2

La diabetes mellitus fue experimentalmente inducida en ratones hembra sanos, con dos dosis de aloxana (aloxana monohidratada Sigma-Aldrich) de 75 mg/kg por animal. La vía de administración fue intraperitoneal. Los ratones tuvieron acceso únicamente a una solución acuosa de glucosa al 10%. Los animales con glucemia ≥ 200 mg/dL fueron seleccionados para las pruebas posteriores.

La aloxana es un derivado oxigenado de la pirimidina el cual está presente como aloxana hidratada en solución acuosa. La acción tóxica de la aloxana en las células beta pancreáticas involucra oxidación de sulfidrilos esenciales (grupos $-SH$), inhibición de la enzima glucoquinasa, generación de radicales libres y perturbaciones en la homeostasis del calcio intracelular. El mecanismo fundamental involucra la aceptación selectiva del compuesto debido a su similitud estructural a la glucosa así como su altamente eficiente mecanismo de aceptación de las células beta pancreáticas (Rohilla y Ali, 2012).

III.10. EFECTO ANTIDIABÉTICO: EEAd, FRACCIONES, COMPUESTO PURO Y ACARBOSA

Se utilizaron 11 grupos de ratones hembra diabéticas, el grupo 1 fue tratado con 1 mL del vehículo, el grupo 2 con una dosis de 50 mg/kg del fármaco hipoglucemiante acarbosa; los grupos 3 al 5 fueron tratados con dosis de 300, 375 y 450 mg/kg del EEAd, respectivamente. Los grupos 6 al 8 fueron tratados con una dosis de 100 mg/kg de las fracciones: FDCMAAd, FAcOEtAd y FAcRAAd. Por último, los grupos 9 al 11 fueron tratados con dosis de 50, 100 y 150 mg/kg del compuesto puro (flavonoide rutina), respectivamente. Se midieron los niveles de glucosa en sangre a las 0, 2 y 4 horas.

III.11. PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA

Se utilizaron 4 grupos de ratones hembra sanas con 24 horas de ayuno. Uno de los grupos fue tratado con 1 mL del vehículo y los otros tres con el EEAd en dosis crecientes de 30, 300 y 3000 mg/kg. Se evaluó la muerte a las 4 y 72 hrs, así como el efecto del EEAd sobre el comportamiento. Posteriormente semanalmente, durante dos semanas, se determinaron las variaciones en el peso corporal y al final del experimento los ratones fueron sacrificados; se extrajeron los siguientes órganos: hígado, intestino, estómago, riñones y bazo, los cuales se pesaron inmediatamente.

III.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las pruebas se analizaron por ANOVA y están expresados como el promedio de 6 datos \pm la desviación estándar (DE), el nivel de significancia fue evaluado por la prueba de Dunnett y Bonferroni, con valores p menores de 0.05.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Las hojas molidas de *Annona diversifolia* Safford (505 g) fueron extraídas por maceración con etanol (6.5 L x 2 semanas) y el extracto fue evaporado hasta sequedad, obteniéndose 47.8 g (9.5% en base seca) de extracto etanólico que se mantuvo a temperatura ambiente en un frasco cerrado hasta su uso.

IV.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EEAd E HIPOGLUCEMIANTES ORALES EN ANIMALES SANOS

Con el objetivo de determinar si el EEAd posee un efecto hipoglucemiante, se administró éste a dosis crecientes de: 300, 600, 900 y 1200 mg/kg.

A las dosis entre 600-1200 mg/kg, el EEAd produjo la muerte de los animales a las 2 horas posteriores a su administración, por lo que se evaluó una dosis intermedia (450 mg/kg) entre las dos que presentaron un mayor efecto.

Tabla 2. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con EEAd a las diferentes dosis evaluadas.

| Dosis EEAd (mg/kg) | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) | Mortalidad (%) |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| Control | 158.2 ± 16.2 | 153.4 ± 25.8 | 153.3 ± 19.9 | ----- |
| 300 | 170.8 ± 16.6 | 116.2 ± 49.0 | 135.8 ± 64.6 | ----- |
| 450 | 167.0 ± 19.2 | 115.2 ± 19.0* | 101.0 ± 30.5* | ----- |
| 600 | 182.8 ± 18.7 | 69.5 ± 19.2* | 57.0 ± 1.4* | 66.7 |
| 900 | 177.0 ± 28.4 | 75.5 ± 18.5* | 75.8 ± 22.1* | 33.3 |
| 1200 | 142.7 ± 17.7 | 83.2 ± 34.0 | 118.0 ^A | 83.3 |

El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

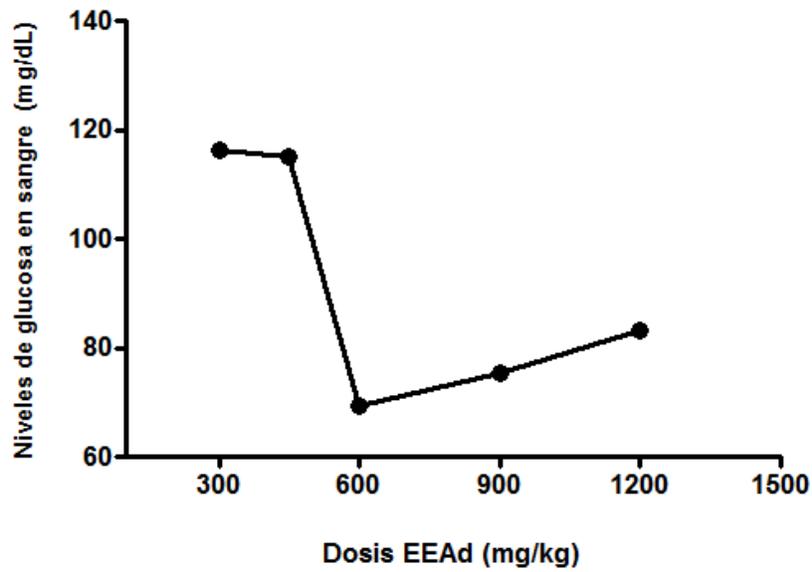
*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

^AResultado del ratón sobreviviente.

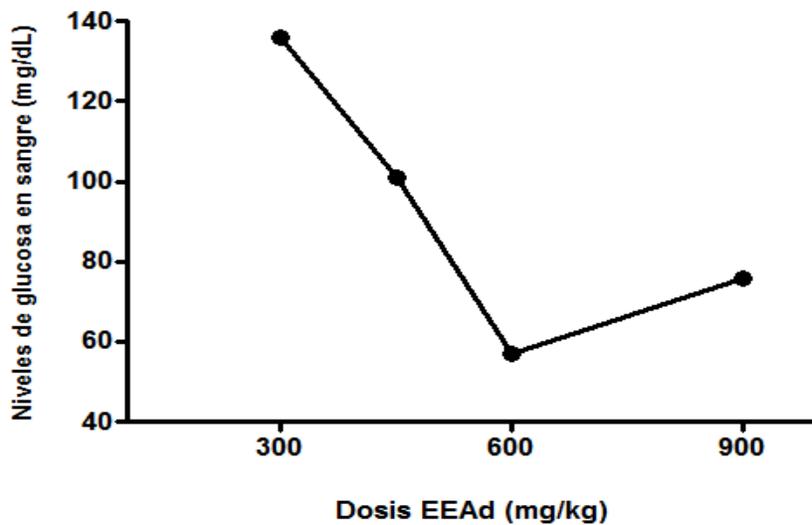
Como se puede observar en la tabla 2, el EEAd produjo un efecto hipoglucemiante con todas las dosis evaluadas. El cual se considera ocurre cuando los valores de glucemia sanguínea disminuyen por debajo de los valores normales (grupo control < 153.3-153.4 mg/dL) (NOM, 2010). Al aumentar la dosis del EEAd aumentó el efecto producido por éste, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al tiempo cero de cada dosis.

Las dosis de 300 y 450 mg/kg del EEAd fueron las que produjeron un efecto hipoglucemiante

significativo en animales sanos sin causar mortalidad. El efecto hipoglucemiante es consistente con lo previamente descrito por Brindis en animales sanos (Brindis et al., 2013). La dosis de 450 mg/kg del EEAd fue seleccionada para la realización de los siguientes experimentos, al ser la que produjo el mayor efecto hipoglucemiante sin producir mortalidad.



Gráfica 1. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos al tiempo dos horas, tratados con EEAd a dosis de 300, 600, 900 y 1200 mg/kg; n=6.

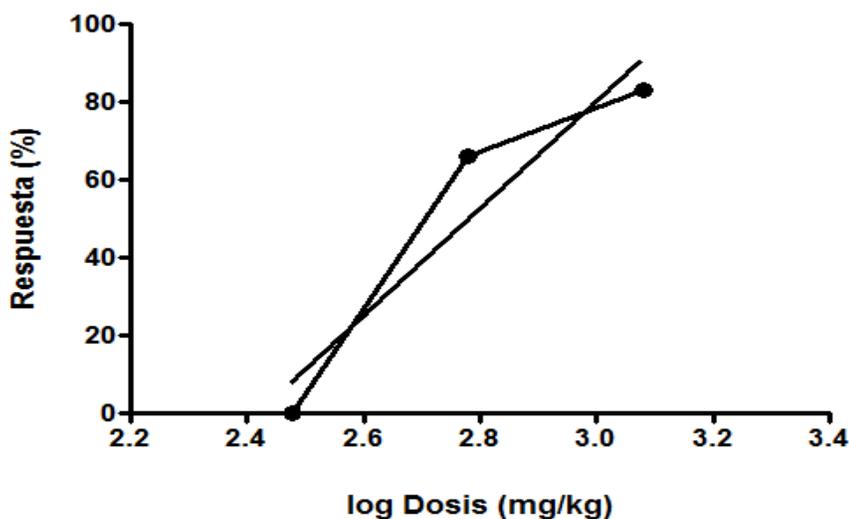


Gráfica 2. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos al tiempo cuatro horas, tratados con EEAd a dosis de 300, 600, 900 y 1200 mg/kg; n=6.

Como se aprecia en las gráficas 1 y 2, el EEAd a la dosis de 600 mg/kg presenta un punto de inflexión en el efecto evaluado, tanto a las dos como a las cuatro horas posteriores a la administración. Al ser la dosis que produjo un mayor efecto y a la que se comenzó a observar una mortalidad en los animales.

Por el tipo de curva invertida, se sugiere que el EEAd produjo un efecto de hormesis, proceso en el cual la exposición a dosis bajas de un agente químico produce un efecto benéfico y a dosis altas un efecto tóxico o viceversa (Mattson, 2008). Ya que como se observa en la tabla 2, al aumentar la dosis del EEAd, éste produjo la muerte de los animales. Sin embargo, se necesita otra dosis que permita graficar otro punto en la curva, y así poder concluir este efecto sin ambigüedad.

La mortalidad producida, permitió graficar una curva dosis-respuesta en animales sanos con el logaritmo de las dosis administradas; obteniéndose una dosis tóxica media (DT_{50}) de 606.0 mg/kg. En este sentido, aunque no se cumple con todo lo marcado en la OECD, puesto que los animales no estaban en ayuno, el EEAd pertenece a la categoría 4. Lo que indica que su consumo debe realizarse con sumo cuidado por sus posibles efectos tóxicos.



Gráfica 3. Curva dosis-respuesta de los ratones sanos tratados con EEAd a las dosis de 300, 600, 900 y 1200 mg/kg; n=6. Ecuación de la gráfica: $y = 138.33x - 334.9$. $r^2 = 0.8960$.

Aun cuando no era el objetivo de este experimento la construcción de la curva dosis-respuesta, por la mortalidad observada (gráfica 3), se pudo determinar una toxicidad preliminar. Cabe mencionar, que estos resultados son consistentes con la prueba de toxicidad aguda, mencionada más adelante en el apartado IV.10.

Con el propósito de determinar si el efecto producido por el EEAd es equiparable al de uno de los fármacos hipoglucemiantes orales, se evaluó el efecto de metformina, glibenclamida y acarbosa en ratones hembra sanos (tabla 3); a las dosis en las que normalmente se prescriben en el humano, 850 mg/kg, 5 mg/kg y 50 mg/kg, respectivamente.

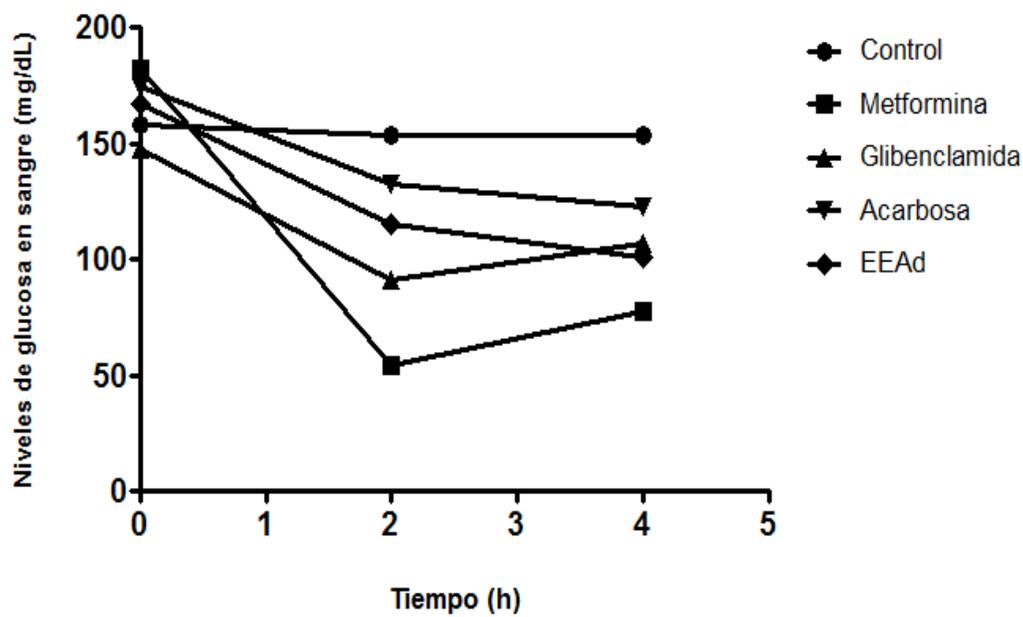
Tabla 3. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con fármacos hipoglucemiantes orales y EEAd.

| Tratamiento (mg/kg) | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Control | 158.2 ± 16.2 | 153.4 ± 25.8 | 153.3 ± 19.9 |
| Metformina 850 | 181.8 ± 18.1 | 54.5 ± 14.1** | 77.2 ± 38.1** |
| Glibenclamida 5 | 147.3 ± 15.3 | 91.2 ± 12.4** | 107 ± 18.9# |
| Acarbosa 50 | 174.5 ± 33.1 | 132.7 ± 15.5 | 123 ± 30.5* |
| EEAd 450 | 167.0 ± 19.2 | 115.2 ± 19.0** | 101.0 ± 30.5** |

El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes comparados con el control a las 2 y 4 horas, respectivamente.



Gráfica 4. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con metformina a dosis de 850 mg/kg, glibenclamida a dosis de 5 mg/kg, acarbosa a dosis de 50 mg/kg y EEAd a dosis de 450 mg/kg; n=6.

Como se puede observar en la tabla 3 y en la gráfica 4, el efecto hipoglucemiante producido por el EEAd es similar al del fármaco acarbosa, el cual se incrementa respecto al tiempo.

En el caso de los fármacos metformina y glibenclamida, el efecto hipoglucemiante es más importante a las 2 horas, que disminuye respecto al tiempo.

IV.3 PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A GLUCOSA Y A SACAROSA EN ANIMALES SANOS

Con el objetivo de aportar información para establecer el mecanismo de acción por medio del cual el EEAd produce su efecto hipoglucemiante, se realizaron pruebas de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) y a la sacarosa (PTOS) en ratones hembra sanos en ayuno.

Los ratones hembra sanos fueron tratados con una dosis del EEAd de 450 mg/kg.

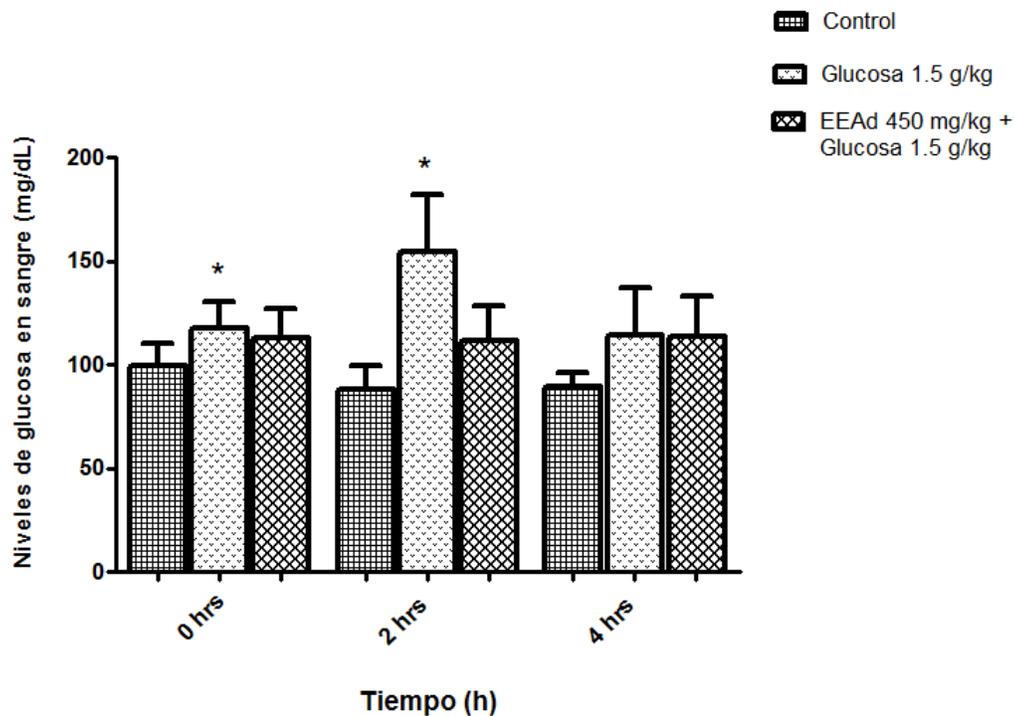
Tabla 4. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con el EEAd a dosis de 450 mg/kg, y con glucosa a dosis de 1.5 g/kg (PTOG).

| Tratamiento | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Control | 99.2 ± 10.8 | 88.2 ± 11.2 | 89.7 ± 6.5 |
| Glucosa 1.5 g/kg | 117.3 ± 12.9 | 154.7 ± 27.4*# | 114.0 ± 23.0 |
| EEAd 450 mg/kg + Glucosa 1.5 g/kg | 113.0 ± 14.3 | 111.3 ± 17.2 | 113.6 ± 19.3 |

El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes respecto al control a las 2 horas.



Gráfica 5. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con el EEAd a dosis de 450 mg/kg, y con glucosa a dosis de 1.5 g/kg (PTOG). Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

Como se observa en la tabla 4 y en la gráfica 5, el grupo control se mantiene sin variaciones en los niveles de glucemia al no recibir ningún tratamiento. En el caso del grupo que fue tratado solo con glucosa, se observa un pico posprandial a las 2 horas. Este produjo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y al grupo tratado con el EEAd. El pico posprandial se vio disminuido en el grupo tratado con el EEAd a la dosis de 450 mg/kg, que inhibe el aumento de los niveles de glucosa en sangre en ratones sanos, indicando que inhibe la absorción de glucosa.

Con la finalidad de determinar si el EEAd además de inhibir la absorción de glucosa, inhibe la hidrólisis de disacáridos y posterior absorción de glucosa, se realizó la prueba de tolerancia oral a la sacarosa.

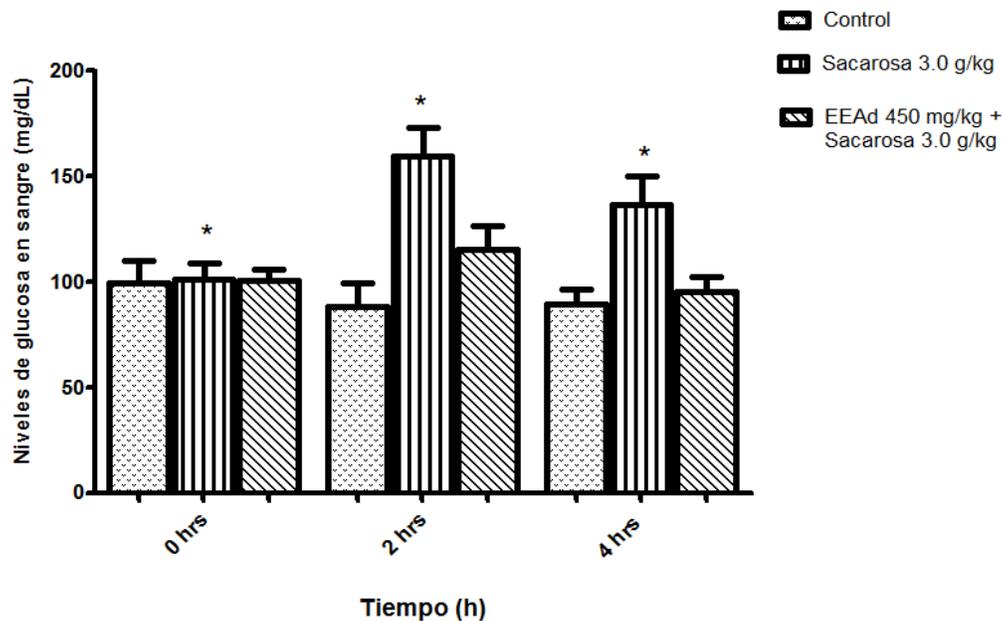
Tabla 5. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con el EEAd a dosis de 450 mg/kg, y con sacarosa a dosis de 3.0 g/kg (PTOS).

| Tratamiento | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Control | 99.2 ± 10.8 | 88.2 ± 11.2 | 89.7 ± 6.5 |
| Sacarosa 3.0 g/kg | 101 ± 8.0 | 159.5 ± 13.6*# | 136.5 ± 13.6*# |
| EEAd 450 mg/kg + Sacarosa 3.0 g/kg | 100.6 ± 5.2 | 115.2 ± 11.0 | 95.4 ± 6.9 |

El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes comparados con el grupo control a las 2 y 4 horas, respectivamente.



Gráfica 6. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con el EEAd a dosis de 450 mg/kg, y con sacarosa a dosis de 3.0 g/kg (PTOS). Los resultados se muestran como promedio \pm DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 5 y gráfica 6, el grupo que fue tratado solo con sacarosa mostró un aumento en los niveles de glucemia, que se observa como un pico posprandial a las 2 horas. Este se ve disminuido por el efecto del EEAd a las 2 horas y continua hasta las 4 horas, al igual que como ocurrió con la inhibición de la absorción de la glucosa.

Con estas dos pruebas, PTOG y PTOS, se propone que el EEAd sí inhibe a las enzimas alfa-glucosidasas presentes en las vellosidades intestinales, que son las enzimas que actúan en la hidrólisis de la sacarosa, maltosa y otros oligosacáridos en monosacáridos (glucosa, fructosa o galactosa). El resultado es una demora en la digestión de los hidratos de carbono con reducción del pico posprandial (Fernández, 2001). Ya que de acuerdo con un estudio *in vitro*, el extracto acuoso de *A. diversifolia* inhibe a la enzima alfa-glucosidasa de levadura de manera competitiva, con un valor similar a la acarbosa (Brindis et al., 2013).

IV.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIDIABÉTICO DEL EEAd EN RATONES CON DM2

Una vez demostrado el efecto hipoglucemiante del EEAd en ratones sanos y parte de su posible mecanismo de acción, se realizó una prueba en ratones diabéticos inducidos experimentalmente mediante la administración del fármaco aloxana. Se utilizaron las dosis de 300 y 450 mg/kg, que en animales sanos fueron las que presentaron el efecto hipoglucemiante más importante sin causar mortalidad; y una dosis intermedia entre éstas, 375 mg/kg.

Tabla 6. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con EEAd a dosis de 300-450 mg/kg.

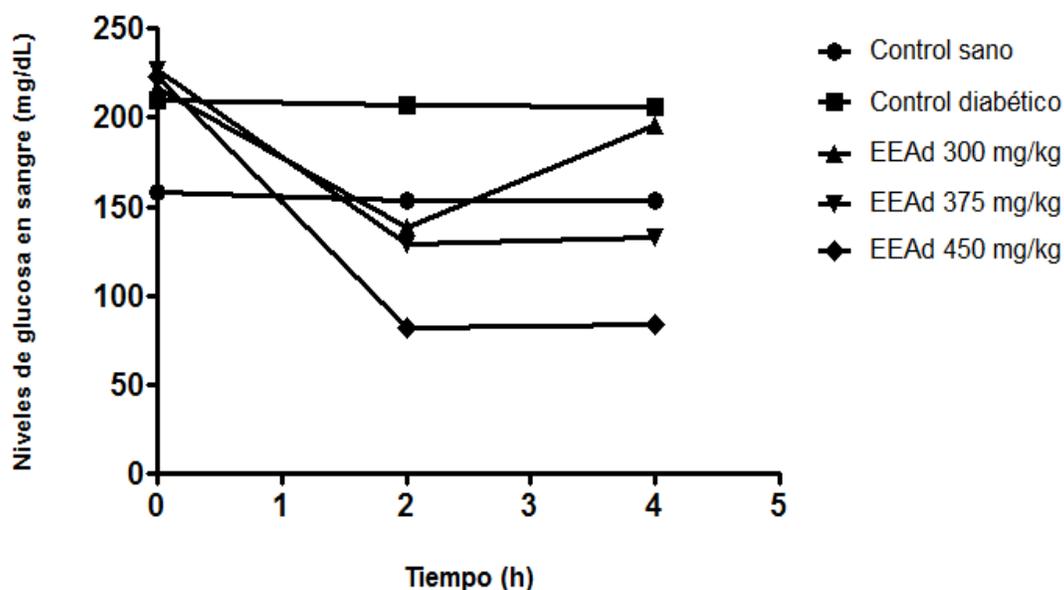
| Tratamiento | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Control sano | 158.2 ± 16.2 | 153.4 ± 25.8 | 153.3 ± 19.9 |
| Control diabético | 209.8 ± 18.1 | 206.6 ± 20.6 | 206.4 ± 17.5 |
| EEAd 300 mg/kg | 216.6 ± 19.4 | 138.0 ± 25.8* | 195.2 ± 37.5 |
| EEAd 375 mg/kg | 226.2 ± 56.6 | 129.2 ± 40.1* | 133.0 ± 13.5* |
| EEAd 450 mg/kg | 222.5 ± 28.8 | 82.2 ± 47.2*##+ | 83.8 ± 34.1*##+ |

Los grupos control fueron tratados con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes comparados con el grupo control sano a las 2 y 4 horas, respectivamente.

+Resultados estadísticamente diferentes comparados con el grupo control diabético a las 2 y 4 horas, respectivamente.



Gráfica 7. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con EEAd a dosis de 300-450 mg/kg; n=6.

Como se observa en los resultados de la tabla 6 y en la gráfica 7, las tres dosis evaluadas produjeron un efecto antihiper glucemiante a las 2 horas que persiste hasta las 4 horas; ya que disminuyeron los niveles de glucosa en sangre por debajo de los valores del grupo control diabético (206.6 - 206.4 mg/dL). La dosis de 450 mg/kg produjo además un efecto hipoglucemiante, al disminuir los niveles de glucosa en sangre por debajo de los valores del grupo control sano (153.4 - 153.4 mg/dL).

IV.5 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EEAd

Una vez que se demostraron las propiedades antidiabéticas del EEAd (Ver VIII.4) se efectuó su fraccionamiento.

El fraccionamiento se realizó por la técnica de reparto (Esquema 2) utilizando 25 g del EEAd, que se suspendió en 20 mL de etanol acuoso 10%. Se emplearon los disolventes

diclorometano (100 mL x 2) y acetato de etilo (100 mL x 2), obteniéndose 3 fracciones: FDCMAd, FAcOEtAd y FAcRAd. Todas las fracciones se concentraron hasta sequedad y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. Se obtuvieron 16.1 g de la FDCMAd, 0.2 g de la FAcOEtAd y 8.8 g de la FAcRAd, con un rendimiento de 62.4%, 0.9% y 34.2%, respectivamente.

IV.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIDIABÉTICO DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS

Se evaluó el efecto antidiabético de cada una de las fracciones obtenidas a la dosis única de 100 mg/kg, en ratones hembra con DM2. Cabe mencionar que en un análisis preliminar, la fracción de diclorometano a 300 mg/kg indujo un 50% de mortalidad en los ratones empleados, por lo cual, se decidió trabajar con una dosis menor.

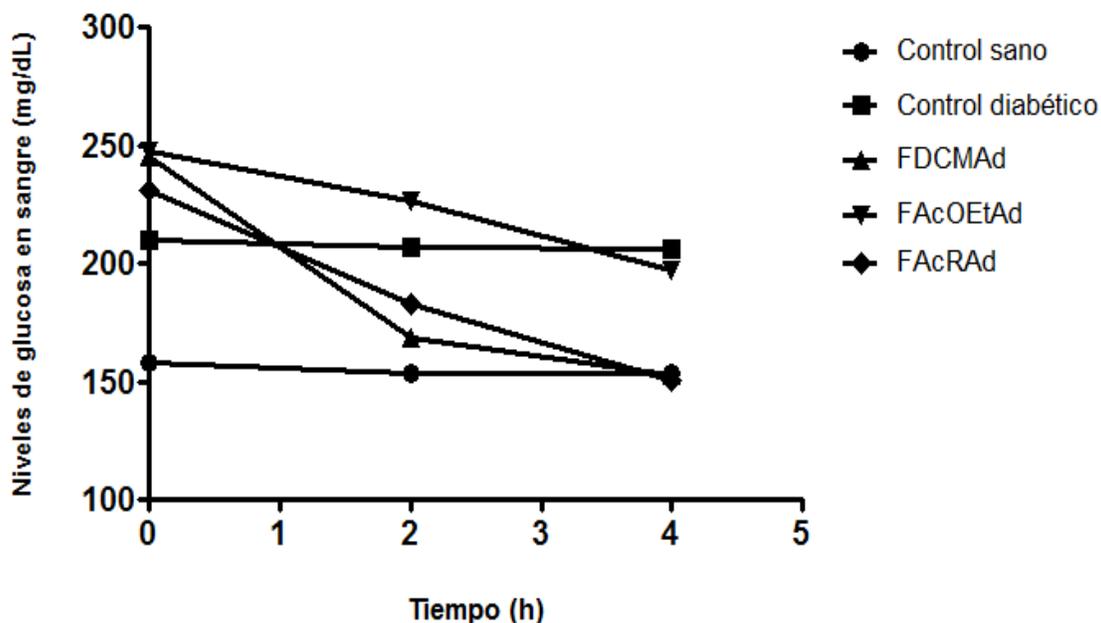
Tabla 7. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con FDCMAd, FAcOEtAd y FAcRAd a dosis de 100 mg/kg.

| Tratamiento | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Control sano | 158.2 ± 16.2 | 153.4 ± 25.8 | 153.3 ± 19.9 |
| Control diabético | 209.8 ± 18.1 | 206.6 ± 20.6 | 206.4 ± 17.5 |
| FDCMAd | 245.6 ± 116.7 | 168.4 ± 118.1 | 152.4 ± 108.0*# |
| FAcOEtAd | 247.4 ± 92.3 | 226.6 ± 68.8 | 197.0 ± 63.7 |
| FAcRAd | 231.2 ± 29.0 | 182.6 ± 49.0 | 150.6 ± 22.3*# |

Los grupos control fueron tratados con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes respecto al grupo control diabético a las 4 horas.



Gráfica 8. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con FDCMAAd, FAcOEtAd y FAcRAAd a dosis de 100 mg/kg; n=6.

De acuerdo con los resultados indicados en la tabla 7 y gráfica 8, las fracciones de diclorometano y acuosa residual produjeron un efecto antihyperglucemiante, al disminuir los niveles de glucosa en sangre por debajo de los valores del grupo control diabético (206.4 – 206.6 mg/dL). Este efecto es más evidente a las 4 horas, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto a éste grupo.

Por otro lado, la fracción de acetato de etilo no presentó un efecto antidiabético, como se observa en la gráfica 8.

IV.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Aun cuando las fracciones de diclorometano y acuosa residual presentaron una actividad muy similar, se decidió purificar a los metabolitos presentes en la FAcRAAd; ya que como se mencionó anteriormente, la FDCMAAd produjo un 50% de mortalidad.

La resolución de la FAcRAd se realizó por medio de una cromatografía en capa fina preparativa (ccfp) (Figura 3), utilizando 30 mg de la fracción y un sistema de elución AcOEt: MeOH: H₂O (10/1.6/1.3) (Solares, 2015).



Figura 3. Cromatografía en capa fina preparativa de la FAcRAd.

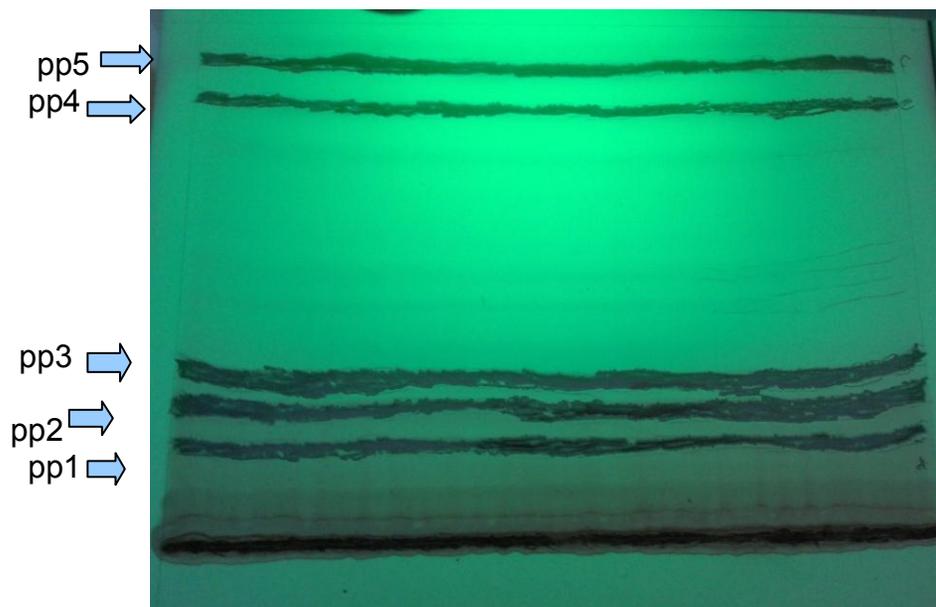
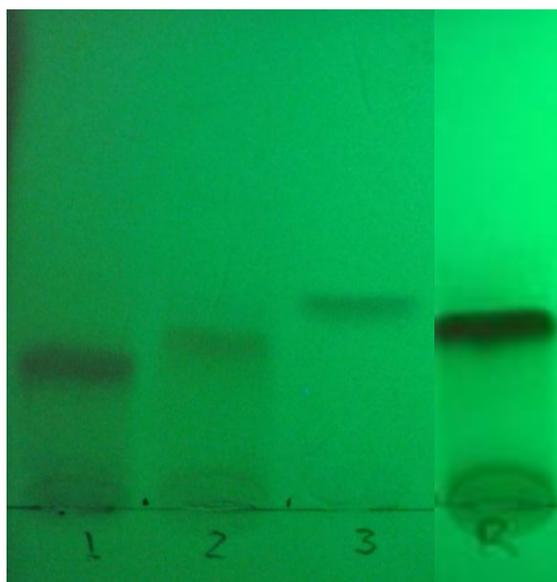


Figura 4. Cromatografía en capa fina preparativa de la FAcRAd compuestos identificados (pp1-pp5).

Como se observa en la figura 4 se identificaron en la ccfp al menos cinco bandas mayoritarias presentes en la fracción acuosa residual. Para su visualización se utilizó una lámpara de luz UV y $AlCl_3$ como agente cromógeno.



Estándar de referencia R: Rutina

Figura 5. Cromatografía en capa fina analítica de los productos puros 1-3 de la FAcRAD.

De los cinco productos identificados, los tres con mayor polaridad fueron comparados con respecto a la rutina. Como se puede observar en la figura 5, se encontró que el producto 2 fue identificado como rutina, al presentar el mismo Rf (0.37) que la muestra auténtica del producto (Solares, 2015).

IV.8 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIDIABÉTICO DE RUTINA EN RATONES CON DM2

Una vez realizada la identificación del flavonoide rutina en la FAcRAAd, el cual se sabe que disminuye rápidamente los niveles de glucosa en plasma (Brindis et al., 2013), y que además aumenta los niveles de insulina en plasma, péptido-C, proteínas totales, hemoglobina total y disminuye la hemoglobina glucosilada (Kamalakkannan y Mainzen, 2006); se realizó la evaluación del efecto antidiabético de este flavonoide a las dosis de 50, 100 y 150 mg/kg en ratones hembra con DM2.

Sabiendo que el extracto acuoso de *Annona diversifolia* Safford, donde está presente la rutina (Brindis et al., 2013), inhibe a las enzimas alfa-glucosidasas, uno de los grupos de ratones hembra con DM2 fue tratado con el fármaco acarbosa a una dosis de 50 mg/kg; el cual posee el mismo mecanismo de acción (Fernández, 2001).

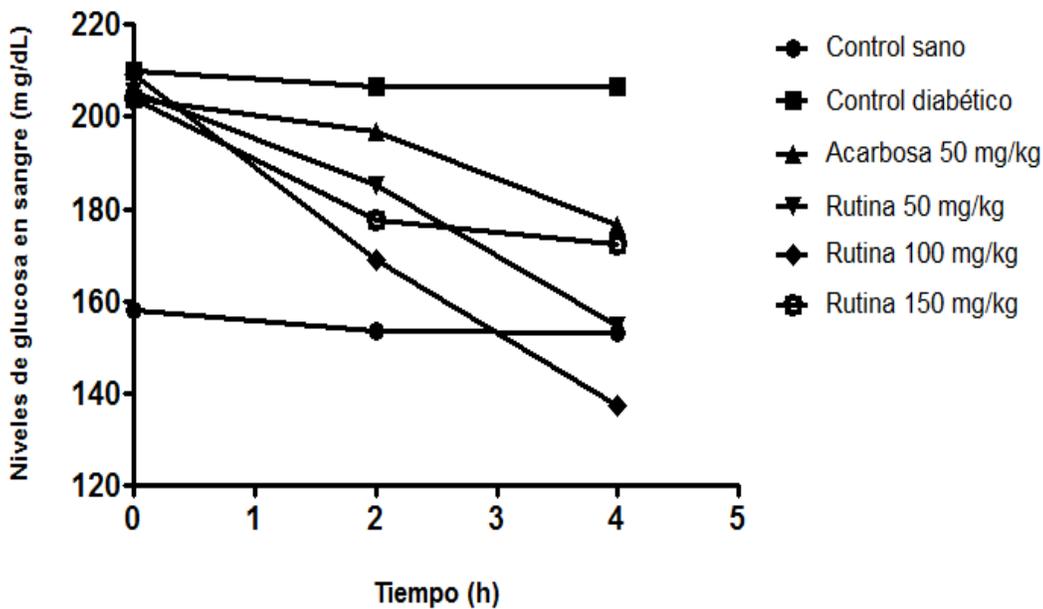
Tabla 8. Niveles de glucosa en sangre de los ratones con DM2 tratados con rutina a dosis de 50-150 mg/kg y con acarbosa a dosis de 50 mg/kg.

| Tratamiento (mg/kg) | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|---------------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|
| Control sano | 158.2 ± 16.2 | 153.4 ± 25.8 | 153.3 ± 19.9 |
| Control diabético | 209.8 ± 18.1 ⁺ | 206.6 ± 20.6 | 206.4 ± 17.5 |
| Acarbosa 50 | 204.0 ± 10.1 | 196.8 ± 14.5 | 176.4 ± 19.6 |
| Rutina 50 | 205.3 ± 7.0 | 185.2 ± 33.2 | 154.7 ± 30.6 ^{*#} |
| Rutina 100 | 209.3 ± 18.5 | 168.8 ± 19.4 | 137.5 ± 17.6 ^{*#} |
| Rutina 150 | 203.8 ± 20.4 | 177.5 ± 16.0 | 172.3 ± 13.3 |

El grupo control de animales sanos fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes respecto al control diabético a las 4 horas.



Gráfica 9. Niveles de glucosa en sangre de ratones con DM2 tratados con rutina a dosis de 50-150 mg/kg y con acarbosa a dosis de 50 mg/kg; n=6.

Como se observa en los resultados de la tabla 8 y en la gráfica 9, las tres dosis evaluadas de rutina presentaron un efecto mayor al producido por la acarbosa.

La rutina a las dosis de 50 y 150 mg/kg solo tuvo un efecto antihiper glucemiante desde las 2 horas que se mantiene con respecto al tiempo a las 4 horas. El cual se considera ocurre cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen por debajo de los valores de un diabético (grupo control diabético) < 206.6-206.4 mg/dL (NOM, 2010).

En el caso de la dosis de 100 mg/kg se observó un claro efecto hipoglucemiante a las 4 horas, ya que los niveles de glucosa en sangre disminuyeron por debajo del valor que mostró el control sano a las 4 horas (153.3 mg/dL).

Por otro lado, la rutina a dosis de 50 y 150 mg/kg presentó un efecto similar al fármaco acarbosa, como se observa en la gráfica 9.

IV.9 PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A GLUCOSA Y A SACAROSA EN ANIMALES

SANOS: EFECTO DE RUTINA

Una vez que se determinó el efecto antidiabético de rutina y que se observó que de las tres dosis administradas, la que produjo un mayor efecto fue la de 100 mg/kg, se realizó la prueba de tolerancia oral a glucosa y a sacarosa con esta dosis en animales sanos con 24 horas de ayuno; con el objetivo de determinar si el flavonoide es el responsable del efecto producido por el EEAd.

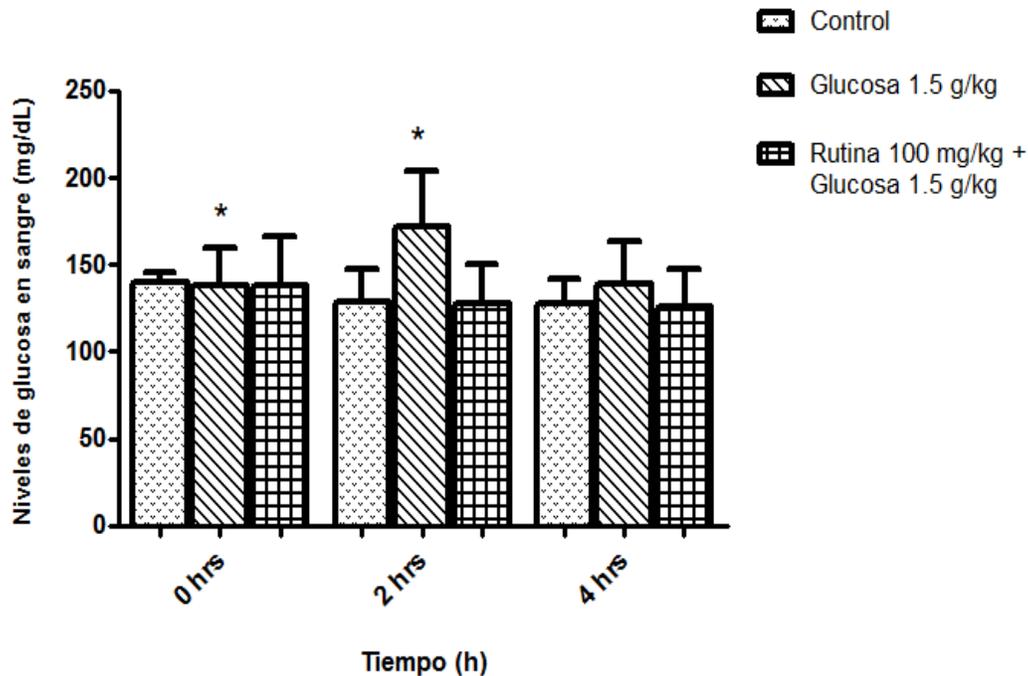
Tabla 9. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con rutina a dosis de 100 mg/kg, y con glucosa a dosis de 1.5 g/kg (PTOG).

| Tratamiento | Glucemia 0 h (mg/dL) | Glucemia 2 h (mg/dL) | Glucemia 4 h (mg/dL) |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Control | 139.7 ± 6.3 | 128.5 ± 19.0 | 127.7 ± 14.5 |
| Glucosa 1.5 g/kg | 137.7 ± 22.1 | 171.8 ± 31.8*# | 139.0 ± 24.1 |
| Rutina 100 mg/kg + Glucosa 1.5 g/kg | 138.0 ± 27.9 | 128.0 ± 22.3 | 125.7 ± 21.3 |

El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

*Resultados estadísticamente diferentes respecto a su tiempo cero.

#Resultados estadísticamente diferentes respecto al grupo control y al grupo tratado con rutina 100 mg/kg y glucosa 1.5 g/kg a las 2 horas.



Gráfica 10. Niveles de glucosa en sangre de los ratones sanos tratados con rutina a dosis de 100 mg/kg, y con glucosa a dosis de 1.5 g/kg (PTOG). Los resultados se muestran como promedio \pm DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

De acuerdo con la tabla 9 y la gráfica 10 se observó que rutina a la dosis de 100 mg/kg sí inhibió la absorción de glucosa, puesto que los niveles de glucosa en sangre de este grupo se mantienen sin cambios significativos. A diferencia del grupo que fue tratado solo con glucosa, el cual presentó un pico posprandial a las 2 horas. Que es estadísticamente diferente del grupo control y del grupo tratado con rutina.

Al obtener estos resultados, se realizó la prueba de tolerancia oral a sacarosa a la misma dosis del flavonoide; no encontrándose un efecto importante.

IV.10 PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA

Para completar el estudio del extracto etanólico de las hojas de *Annona diversifolia* Safford como una posible alternativa de tratamiento para la DM2, se realizó una prueba de toxicidad aguda. En la cual se buscó establecer cuáles son los efectos adversos producidos en animales sanos a lo largo de dos semanas después de una única administración del EEAd, así como una posible alteración sobre algunos órganos blanco importantes.

Para ello se administró el EEAd a las dosis de 30, 300 y 3000 mg/kg, y después de dos semanas de observación se extrajeron los órganos: hígado, intestino, estómago, riñones y bazo.

Tabla 10. Variación del peso corporal de los ratones sanos en la prueba de toxicidad aguda, tratados con EEAd a las diferentes dosis evaluadas.

| Tratamiento | Pesos (g) semana 0 | Pesos (g) semana 1 | Pesos (g) semana 2 |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Control | 19.3 ± 1.0 | 19.3 ± 1.0 | 20.0 ± 0 |
| EEAd 30 mg/kg | 19.7 ± 1.5 | 19.7 ± 1.5 | 20.3 ± 1.5 |
| EEAd 300 mg/kg | 19.0 ± 1.1 | 18.0 ± 2.5 | 19.7 ± 2.0 |
| EEAd 3000 mg/kg | 18.3 ± 2.0 | --- | --- |

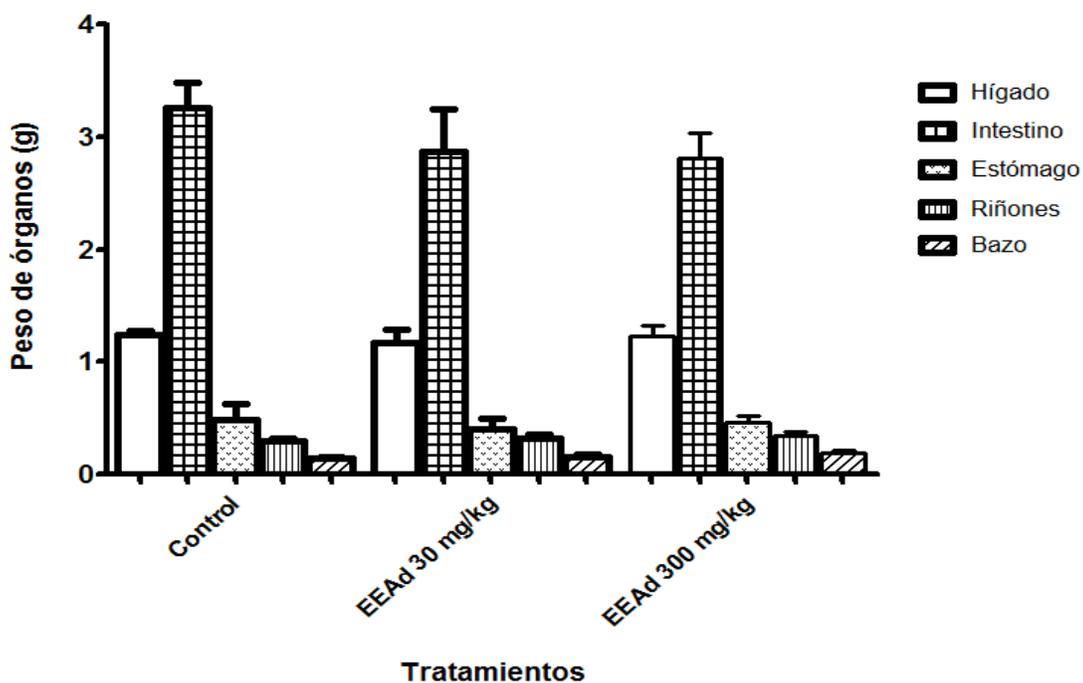
El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

Los ratones tratados con la dosis de 3000 mg/kg murieron horas después de la administración del EEAd.

Tabla 11. Variación de peso de los órganos analizados de los ratones sanos tratados con EEAd a dosis de 30 y 300 mg/kg, en prueba de toxicidad aguda.

| Tratamiento | Peso (g) hígado | Peso (g) intestino | Peso (g) estómago | Peso (g) riñones | Peso (g) bazo |
|----------------|-----------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Control | 1.2415 ± 0.0286 | 3.2573 ± 0.2238 | 0.4784 ± 0.1441 | 0.2985 ± 0.0191 | 0.14141 ± 0.0120 |
| EEAd 30 mg/kg | 1.1641 ± 0.1185 | 2.8737 ± 0.3705 | 0.4008 ± 0.0924 | 0.3210 ± 0.0345 | 0.1477 ± 0.0218 |
| EEAd 300 mg/kg | 1.2288 ± 0.0889 | 2.8094 ± 0.2279 | 0.4629 ± 0.0553 | 0.3428 ± 0.0368 | 0.1839 ± 0.0246 |

El grupo control fue tratado con 1 mL del vehículo. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.



Gráfica 11. Variación de peso de los órganos analizados de los ratones sanos tratados con EEAd a dosis de 30 y 300 mg/kg, en prueba de toxicidad aguda. Los resultados se muestran como promedio ± DE, n= 6. Análisis por ANOVA de 1 vía.

La dosis de 3000 mg/kg produjo una mortalidad del 100% de los animales tratados. En los animales restantes, la administración del EEAd no produjo variación del peso corporal.

En la gráfica 11 se observa que la administración del EEAd a las dosis de 30 y 300 mg/kg no afectó el estado de los órganos extraídos.

Los efectos observados en el comportamiento de los ratones tratados con las dosis utilizadas del EEAd fueron fatiga y somnolencia.

La realización de la prueba de toxicidad aguda en condiciones de ayuno, como lo establece la OECD, permitió calcular la dosis letal media (DL_{50}) del EEAd; que fue de 646.2 mg/kg, lo que lo clasifica como un producto de toxicidad de nivel 4. Esta dosis fue cercana a la obtenida en los animales con alimento, DT_{50} = 606.0 mg/kg (ver IV.2), entrando en la misma clasificación; lo cual confirma que el uso de las hojas de la planta *A. diversifolia* Safford para el control de la DM debe realizarse con precaución.

V. CONCLUSIONES:

- El EEAd produjo un efecto hipoglucemiante en animales sanos.
- De acuerdo con los resultados, se sugiere que el EEAd produjo un efecto de hormesis, siendo la dosis de 600 mg/kg la que presentó el máximo efecto farmacológico.
- El EEAd inhibió la absorción de glucosa y la hidrólisis de sacarosa.
- El EEAd presentó un efecto antihiper glucemiante e hipoglucemiante en animales con DM2.
- De las tres fracciones obtenidas del EEAd, solamente las fracciones de diclorometano y acuosa residual presentaron actividad antidiabética.
- De los cinco compuestos aislados como mayoritarios en la FAcRA, uno de ellos fue identificado como el flavonoide rutina.
- El flavonoide rutina presentó un efecto antihiper glucemiante e hipoglucemiante, además de inhibir la absorción de glucosa; sin embargo, no inhibió la hidrólisis de sacarosa en las condiciones experimentales empleadas.
- La dosis de rutina que produjo el mayor efecto antidiabético (100 mg/kg), no disminuyó los niveles de glucemia a los valores que se obtuvieron con la dosis del EEAd que produjo el mayor efecto (450 mg/kg). Indicando que la rutina no es responsable en su totalidad del efecto causado por el EEAd.
- En la prueba de toxicidad aguda la DL_{50} del EEAd fue de 646.2 mg/kg en animales sanos; lo que lo clasifica como un producto de toxicidad de nivel 4 de acuerdo con la OECD, indicando que su uso debe realizarse con mucha precaución.

VI. BIBLIOGRAFÍA:

1. Adewole S., Ojewole J. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 2009; 6 (1): 30-41.
2. Adeyemi O., Komolafe A., Adewole S., Obuotor M., Adenowo K. Anti hiperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines* 2009; 6 (1): 62-69.
3. Andrade-Cetto A., Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 99: 325-348.
4. Arroyo J., Martínez J., Ronceros G., Palomino R., Villarreal A., Bonilla P., Palomino C., Quino M. Efecto hipoglucemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. *Anales de la Facultad de Medicina* 2009; 70 (3): 163-167.
5. Atlas de la diabetes de la FID sexta edición, 2013 obtenido de https://www.idf.org/sites/default/files/SP_6E_Atlas_Full.pdf
6. Berdonces J. Gran diccionario ilustrado de las Plantas Medicinales descripción y aplicaciones. Editorial Océano. 2009. Pp. 9-10.
7. Brindis F., González-Trujano M., González-Andrade M., Aguirre Hernández E., Villalobos-Molina R. Aqueous extract of *Annona macrophyllata*: a potential α -glucosidase inhibitor. *BioMed Research International* 2013; (2013): 1-6.
8. Brunton L., Chabner B., Knollman B. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Doceava edición en español. Editorial Mc Graw Hill 2012. Pp. 1243, 1248, 1266-1267, 1270.

9. Calzada F., Barbosa E., Cedillo-Rivera R. Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research* 2003; 17: 618–619.
10. Calzada F., Velázquez C., Cedillo-Rivera R., Esquivel B. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytotherapy Research* 2003; 17: 731–732.
11. Chasquibol N., Lengua L., Delmás I., Rivera D., Bazán D., Aguirre R., Bravo M. Alimentos funcionales y fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* 2003; 5 (2): 9-20.
12. Cruz E. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal Cultivo de anona 2002; 7: 5-20.
13. Cubillos V., López C., Alberdi A. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de páncreas en perros diabéticos inducidos con aloxano. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2008; 40: 169-177.
14. Escamilla C., Cuevas E., Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 2009; 52 (2): 73-75.
15. Fagetti A. Fundamentos de la medicina tradicional mexicana. CRIM UNAM, Centro INAH-Morelos 2011; 137-151.
16. Federación Mexicana de Diabetes, A. C. Estadísticas Diabetes INEGI 2013 obtenido de <http://fmdiabetes.org.mx/estadisticas-diabetes-inegi-2013/>
17. Fernández I. Actualización en antidiabéticos orales. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 2001; 25 (2): 33-45. <http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/200102-01.pdf>
18. Flórez J. Farmacología humana. Quinta edición. Editorial Elsevier España 2008. Pp. 1063-1067.

19. Gardner D., Shoback D. Greenspan Endocrinología básica y clínica. Novena edición, Editorial Mc Graw Hill 2012. Pp. 590-591, 600, 602, 605.
20. Guevara I., Rodríguez C., Pérez M., León O., Rodríguez S., Alvarez D., Castañeda J., Vega J. Ensayo de toxicidad aguda oral de un fitofármaco obtenido a partir del pseudotallo de *Musa paradisiaca* L. Acta Farmacéutica Bonaerense 2003; 22 (1): 57-59.
21. Guía Práctica Clínica IMSS. Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. Actualización 2012 obtenido de http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/000GER_DiabetesMellitus.pdf
22. Guía Práctica Clínica. Diagnóstico, metas de control ambulatorio y referencia oportuna de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención, México: Secretaría de Salud, 2008 obtenido de http://www.isssteags.gob.mx/guias_praticas_medicas/gpc/docs/SSA-093-08-ER.pdf
23. Guyton A., Hall J. Tratado de Fisiología médica. Doceava edición en español. Editorial Elsevier España 2011. Pp. 950-951.
24. Iglesias R., Barutell L., Artola S., Serrano R. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. Diabetes Práctica 2014; 05: 1-24.
25. Julián-Loeza A., Santos-Sánchez N., Valadez-Blanco R., Sánchez-Guzmán B., Salas-Coronado R. Chemical composition, color, and antioxidant activity of three varieties of *Annona diversifolia* Safford fruits. Industrial Crops and Products 2011; 34: 1262-1268.

26. Kaleem A., Medha P., Ahmed Q U., Asif M., Bano B. Beneficial effects of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Singapore Medical Journal 2008; 49 (10): 800-804.
27. Kamalakkannan N., Mainzen P. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 2006; 98: 97-103.
28. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetología 2008; 51: 216-226.
29. Luna-Cazás L., González-Esquinca A. Actividad antibacteriana de extractos de *Annona diversifolia* Safford y *Annona pupurea* Mociño & Sessé ex dunal. Polibotánica 2008; 25: 121-125.
30. Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria 2002; 17 (6): 271-278.
31. Mattson M. Hormesis defined. Ageing Research Reviews 2008; 7 (1): 1-7.
32. Murillo E., Tique M., Ospina L., Lombo O. Evaluación preliminar de la actividad hipoglicemiante en ratones diabéticos por aloxano y capacidad antioxidante in vitro de extractos de *Bauhinia kalbreyeri* Harms. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas 2006; 35 (1): 64-80.
33. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 obtenido de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
34. Norma Oficial Mexicana, NOM-015-SSA2-2010 obtenido de http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/dirgral/marco_juridico/normas/nom_14.pdf
35. OECD guideline for testing of chemicals 2001.

36. Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas 2005; 62:12-15.
37. Olokoba A., Obateru O., Olokoba L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. Oman Medical Journal 2012; 27(4): 269-273.
38. Olvera-Granados C., Leo-Amador G., Hernández-Montiel H. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? Boletín Médico del Hospital Infantil de México 2008; 65: 306-324.
39. Otero M. et. al. Producción de ilama (*Annona diversifolia* Saff.) en el trópico seco de Guerrero, México. Revista Chapingo. Serie Horticultura 2006; 12 (2): 137-143.
40. Pérez Davison G., Restrepo Manrique R., Martínez Sánchez G. Hormesis: Antecedentes e Implicaciones en los Sistemas Biológicos. Latin American Journal of Pharmacy 2009; 28 (6): 954-960.
41. Perspectivas políticas sobre medicamentos de la OMS-Medicina Tradicional- Necesidades Crecientes y Potencial. Organización Mundial de la Salud Ginebra, 2002 obtenido de <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2295s/s2295s.pdf>
42. Polonsky K., M.D. The Past 200 Years in Diabetes. The New England Journal of Medicine 2012; 367: 1332-40.
43. Rohilla A., Ali S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects, India 2012; 3 (2): 819-823.
44. Solares P. J. I. Actividad antidiabética y efecto sobre algunos marcadores de estrés oxidativo a partir del extracto etanólico de las hojas de *Annona cherimola* Mill. en ratas con diabetes mellitus tipo 2. Tesis maestría 2015.
45. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiological Research 2001; 50: 536-546.

46. Tébar F., Escobar F. La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica. Primera edición, Editorial Médica Panamericana 2009. Pp. 2,14.
47. Velázquez L. Farmacología Básica y Clínica. 18ª edición, Editorial Médica Panamericana 2008. Pp. 630- 637.
48. Velázquez C., Calzada F., Torres J., González F., Ceballos G. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 103: 66-70.
49. Villarreal R., Romo J. Educación y expectativa de vida en pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 2014; 52 (3): 316-21.