



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA DE *Rhizophora mangle* L. Y
DE LAS HOJAS DE *Bromelia karatas* L. SOBRE LA GLUCONEOGÉNESIS
HEPÁTICA EN RATAS STZ-NA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GERARDO MATA TORRES VALLE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO, 2017



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.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/803/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de octubre de 2016** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **MATA TORRES VALLE GERARDO** con número de cuenta **306221547** con la tesis titulada **"EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA DE *Rhizophora mangle* L. Y DE LAS HOJAS DE *Bromelia karatas* L. SOBRE LA GLUCONEOGENESIS HEPÁTICA EN RATAS STZ-NA"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: DRA. TATIANA FIOREDELISIO COLL
Vocal: DRA. ANDREA SACHI DÍAZ VILLASEÑOR
Secretario: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Suplente: DR. SOL CRISTIANS NIIZAWA
Suplente: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de diciembre de 2016


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/mmm

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad para realizar mis estudios de maestría.

Al CONACYT (CVU: 627592): por la beca que me ayudó para la realización de mis estudios de posgrado.

Al proyecto de DGAPA PAPIIT IN 228216, a cargo del Dr. Adolfo Andrade Cetto, por la aportación de los recursos para la realización de los experimentos.

AL Dr. Adolfo Andrade Cetto por ser el tutor principal de este proyecto asesorías brindadas a lo largo de la realización del mismo, así como a la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera y al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por su guía como parte del comité tutor de este proyecto.

Índice

_____	1
Índice de figuras _____	5
Índice de tablas _____	6
Abreviaturas _____	7
Resumen _____	9
Abstract _____	11
Introducción _____	13
OBJETIVOS _____	15
HIPÓTESIS _____	16
ANTECEDENTES _____	17
Diabetes mellitus _____	17
<i>Diabetes mellitus tipo 1</i> _____	17
<i>Diabetes mellitus tipo 2</i> _____	18
<i>Diabetes gestacional</i> _____	18
<i>Otros tipos específicos</i> _____	18
<i>Alteración en tolerancia a la glucosa y alteración de glucosa en ayuno</i> _____	18
Diagnóstico _____	18
Epidemiología _____	19
Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 _____	20
Homeostasis de la glucosa _____	23
<i>Glucagon</i> _____	24
<i>Insulina</i> _____	24
Regulación hepática de glucosa _____	25
<i>Gluconeogénesis</i> _____	25
<i>Propiedades G-6-Pasa</i> _____	28
<i>Inhibición del sistema G-6-Pasa</i> _____	29
Metformina _____	29
Etnofarmacología _____	31
<i>Rhizophora mangle L.</i> _____	32
<i>Características morfológicas y antecedentes farmacológicos</i> _____	32
<i>Bromelia karatas L.</i> _____	34
<i>Características morfológicas y antecedentes farmacológicos</i> _____	34
Modelo STZ-NA _____	36
Metodología _____	37
Colecta del material biológico _____	37
Elaboración del extracto etanol-agua de <i>R. mangle</i> _____	37
Elaboración del extracto acuoso de <i>B. karatas</i> _____	37
Cálculo de DER (Drug extract ratio) _____	37

<i>Animales experimentales</i>	38
<i>Inducción del modelo STZ-NA</i>	38
<i>Grupos experimentales</i>	38
<i>Prueba de tolerancia a piruvato</i>	39
<i>Obtención de microsomas</i>	39
<i>Cinética de inhibición dosis-respuesta</i>	40
<i>Análisis de resultados</i>	40
RESULTADOS	41
<i>Cálculo de DER</i>	41
<i>Prueba de tolerancia a piruvato</i>	41
<i>Análisis área bajo la curva</i>	46
<i>Cinética enzimática de Glucosa-6-Fosfatasa</i>	47
<i>Discusión</i>	52
<i>Conclusiones y perspectivas</i>	55
<i>Referencias</i>	56

Índice de figuras

Figura 1. Fisiopatología diabetes mellitus _____	21
Figura 2. Señalización de la insulina en tejido sin resistencia _____	22
Figura 3. Señalización de la insulina en tejido con resistencia _____	23
Figura 4. Papel de la insulina en la regulación transcripcional de las enzimas paso limitantes de la gluconeogénesis. _____	26
Figura 5. Esquema de gluconeogénesis _____	27
Figura 6. Esquema del complejo glucosa-6-fosfatasa _____	28
Figura 7. Mecanismo de acción del fármaco metformina _____	30
Figura 8. Ejemplar de herbario <i>Rhizophora mangle</i> _____	32
Figura 9. Mapa de distribución de <i>Rhizophora mangle</i> en México _____	33
Figura 10. Ejemplar de herbario de <i>Bromelia karatas</i> _____	34
Figura 11. Mapa de distribución de <i>Bromelia karatas</i> en México _____	35
Figura 12. Gráfica de glucosa plasmática en prueba de tolerancia a piruvato_	36
Figura 13. Gráfica de áreas bajo la curva de prueba de tolerancia a piruvato_	47
Figura 14. Fotografía del ensayo de inhibición de la G-6-Pasa del ácido clorogénico _____	48
Figura 15. Fotografía del ensayo de inhibición de la G-6-Pasa del extracto <i>R. mangle</i> _____	49
Figura 16. Fotografía del ensayo de inhibición de la G-6-Pasa del extracto de <i>B. karatas</i> _____	50
Figura 17. Gráfica concentración inhibición de la G-6-Pasa. _____	51

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros de diagnóstico de diabetes mellitus _____	19
Tabla 2. Grupos experimentales _____	39
Tabla 3. Rendimiento de los extractos _____	41
Tabla 4. Valores medios de glucosa plasmática \pm SEM en prueba de tolerancia a piruvato _____	42
Tabla 5. Valores medios de área bajo la curva \pm SEM de prueba de tolerancia a piruvato _____	46
Tabla 6. Valores medios de la densidad óptica \pm SEM en curvas concentración-inhibición G-6-Pasa _____	50

Abreviaturas

Akt	Proteína cinasa B
AMP	Adenosin monofosfato
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATP	Adenosin trifosfato
AUC	Área bajo la curva
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo2
F-1,6-BisPasa	Fructosa-1,6-BisFosfatasa
FPG	Glucosa plasmática en ayuno
G-6-P	Glucosa-6-Fosfato
G-6-Pasa	Glucosa-6-Fosfatasa
GLUT 4	Transportador de glucosa isoforma 4
GTP	Guanosin trifosfato
H	Control hiperglucémico
HbA1c	Hemoglobina glicada
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil-etanosulfónico
HP	Hiperglucémico + piruvato
HPBk	Grupo experimental con extracto <i>Bromelia karatas</i>
HPM	Hiperglucémico + piruvato + metformina
HPRm	Hiperglucémico + extracto de <i>Rhizophora mangle</i>

I.P.	Intraperitoneal
I.V.	Intravenoso
IFG	Alteración de glucosa en ayuno
IGT	Alteración en tolerancia a la glucosa
IRS	Sustrato del receptor de insulina
N	Control normoglucémico
NA	Nicotinamida
NP	Normoglucémico + piruvato
OGTT	Prueba de tolerancia a glucosa oral
PC	Piruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa
PEPCK-C	Fosfoenolpiruvato carboxicinasa citosólica
PEPCK-M	fosfoenolpiruvato carboxicinasa mitocondrial
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
RI	Resistencia a la insulina
SDS	Dodecilsulfato sódico
STZ	Estreptozotocina
Tg	Triglicéridos
TNF	Factor de necrosis tumoral



Resumen

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad con una alta prevalencia a nivel mundial, siendo la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) la más importante, ya que engloba aproximadamente el 90% de los pacientes con esta patología. Al tratarse de una enfermedad de carácter crónico-degenerativo, los sistemas de salud se ven ampliamente afectados por los altos costos que tiene su tratamiento. Actualmente el tratamiento de la DM2 consiste en cambiar la rutina alimentaria y un aumento en la actividad física del paciente, complementado con fármacos los cuales son denominados hipoglucemiantes orales.

En las comunidades de México, la medicina tradicional es una práctica que se encuentra fuertemente arraigada y es utilizada en el tratamiento de diferentes enfermedades, entre ellas se encuentra la DM. La etnofarmacología es la ciencia multidisciplinaria encargada de verificar la eficacia farmacológica de los productos naturales que se utilizan en la medicina tradicional, además de ser una fuente importante para el descubrimiento de nuevas moléculas que pudieran tener un efecto terapéutico y con ello desarrollar fitomedicamentos o medicamentos alópatas.

Entre las plantas que son utilizadas para el tratamiento de la DM2 en las comunidades de México, se encuentran reportadas *Rhizophora mangle* y *Bromelia karatas*, las cuales ya cuentan con antecedentes farmacológicos de tener efecto hipoglucemiante.

En el presente estudio, se dilucidó si los extractos de la corteza de *R. mangle* y de las hojas de *B. karatas* disminuyen los niveles de glucosa plasmática al inhibir la producción de glucosa hepática. Dicho trabajo consistió en dos partes principales, la primera, un estudio *in vivo* en el cual se utilizaron ratas Wistar con 18 horas de ayuno, que fueron sometidas a una prueba de tolerancia a piruvato para observar el efecto de las plantas sobre la vía metabólica. La segunda vertiente de este experimento fue evaluar la eficacia de los extractos *in vitro*, para lo cual se utilizaron microsomas hepáticos aislados de rata Wistar en ayuno de 18 horas, con la finalidad de observar la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), la cual es la última enzima en la gluconeogénesis.

Como resultado se observa que el extracto acuoso de *B. karatas* no presenta ningún efecto inhibitorio sobre la gluconeogénesis tras la prueba de tolerancia a



piruvato *in vivo*. En cuanto a la prueba *in vitro*, a pesar de que el extracto de *B. karatas* logra inhibir a G-6-Pasa, la IC₅₀ es mayor al control.

En el caso del extracto etano-agua de *R. mangle* se observa una disminución en los niveles de glucosa plasmática a lo largo de 90 minutos en las ratas sometidas a la administración de piruvato. Por otro lado, la enzima G-6-Pasa es inhibida en su totalidad con *R. mangle*, arrojando una IC₅₀ similar al ácido clorogénico (fármaco control).

En conclusión, el efecto hipoglucemiante reportado de *B. karatas* es independiente a la inhibición de la producción de glucosa hepática, contrastado con lo observado en el caso de *R. mangle*, en donde la inhibición de la gluconeogénesis es el mecanismo de acción del efecto hipoglucemiante.



Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a disease with worldwide high prevalence, being type 2 diabetes (T2D) the most important because nearly 90% of the patients present this condition. Worldwide the health systems are affected, because is a chronic degenerative disease, the long-term treatment generates high costs. Nowadays T2D is treated predominantly with life style changes together with oral hypoglycemic agents.

The Mexican people who lives in indigenous communities traditionally uses medicinal plants to treat a variety of ailments, this practice is part of the whole conception that they have of the environment and health. Ethnopharmacology can be seen as a multidisciplinary discipline, which main objective is to test the pharmacological efficacy of the traditional used natural products, in the last years it has been an important source for the discovery of new molecules which may have a therapeutic effect and can be further developed in phytomedicines or allopathic drugs.

Among the plants traditionally used for the treatment of T2D in Mexico, we found *Rhizophora mangle* (RM) and *Bromelia karatas* (BK), for both plants the acute hypoglycemic effect has been previously reported.

The aim of the present study was to test if the bark of RM and the leaves of BK can decrease de plasmatic glucose, by the inhibition of the hepatic glucose output, targeting gluconeogenesis.

For this purpose, two experiments were carried out; firstly, a pyruvate tolerance tests were performed in Wistar rats with 18 hours of fasting, (*in vivo* study). Secondly, the effectiveness of the extracts was evaluated in isolated rat liver microsomes to observe the inhibition of glucose 6-phosphatase (G-6-Pase), which is the last enzyme in the gluconeogenetic pathway (*in vitro* study).

The aqueous extract of *B. karatas* shows no inhibitory effect on gluconeogenesis during the pyruvate tolerance test, and it presents a high IC₅₀ value. Contrary, the ethanolic extract of *R. mangle* decreased plasma glucose levels after the administration of pyruvate; while G-6-Pase is inhibited entirely with an IC₅₀ similar to chlorogenic acid (control drug).



In conclusion and based on the here presented results; the glucose lowering effect of *B. karatas* is independent of the inhibition of the hepatic glucose output. While the hypoglycemic effect of *R. mangle*, is by the inhibition of gluconeogenesis, blocking the glucose exit from the liver cell.



Introducción

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa que se caracteriza por presentar hiperglucemia, así como trastornos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, derivados de una mala acción y/o secreción de insulina. Esta enfermedad tiene una gran relevancia a nivel mundial, debido a su alta prevalencia.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es el tipo de mayor importancia ya que engloba el 90% de los casos de diabetes a nivel mundial (American Diabetes Association, 2014), y se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina (RI). La RI se define como la incapacidad de los órganos y tejidos blanco (tejido adiposo, muscular y hepático) a reaccionar al estímulo de dicha hormona, lo cual trae como consecuencia la hiperglucemia y otros trastornos metabólicos dependiendo del tejido (Stumvoll, Goldstein, & van Haeften, 2005).

En el hígado, la deficiente señalización de la insulina trae como principal consecuencia el aumento en la producción de glucosa, tanto por la vía de glucogenólisis (Postic, Dentin, & Girard, 2004) y como por gluconeogénesis, siendo la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) la encargada de llevar a cabo la última reacción en ambas vías metabólicas. La G-6-Pasa, puede ser inhibida por moléculas sintetizadas químicamente, tanto por productos naturales como es el caso del ácido clorogénico, entre otros (Arion et al., 1997).

Los pacientes diabéticos son tratados con hipoglucemiantes orales los cuales tienen diferentes mecanismos de acción, entre ellos se encuentran las biguanidas, las cuales llevan a cabo la inhibición de la producción hepática de glucosa. Un ejemplo de biguanida es la metformina, la cual tiene su base en la galegina, una guanida aislada de *Galega officinalis*, para posteriormente, por síntesis química, obtenerse el fármaco.

Al igual que la metformina hay otros fármacos que tienen su origen en alguna especie vegetal; la etnofarmacología es la ciencia multidisciplinaria encargada de tomar el conocimiento de la medicina tradicional, para llevar a cabo pruebas farmacológicas y químicas y así obtener una nueva molécula la cual pueda convertirse en un fitomedicamento o medicamento que ayude a diversas patologías, entre ellas la DM.



Entre las especies vegetales que cuentan con antecedente como hipoglucemiante se encuentran el mangle rojo (*Rhizophora mangle*) y la piñuela (*Bromelia karatas*), ya que ambas especies cuentan con reportes de campo y estudios farmacológicos agudos, los cuales son complementados por protocolos que evalúan su efecto hipoglucemiante de manera crónica (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013; Andrade-Cetto & Rubalcaba-Mares, 2012), y es por ello que son las especies elegidas para llevar a cabo la prueba farmacológica sobre la inhibición de gluconeogénesis hepática, como su probable mecanismo de acción.



OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar el efecto de los extractos de la corteza de *Rhizophora mangle* y de las hojas de *Bromelia karatas* sobre la inhibición de la gluconeogénesis.

PARTICULARES

- Evaluar el efecto de los extractos de la corteza de *R. mangle* y de las hojas de *B. karatas* sobre la inhibición de la gluconeogénesis hepática *in vivo* en ratas STZ-NA.
- Evaluar el efecto de los extractos de la corteza de *R. mangle* y de las hojas de *B. karatas* sobre la inhibición de la Glucosa-6-fosfatasa *in vitro* en microsomas hepáticos, obteniendo la IC₅₀ correspondiente.



HIPÓTESIS

- El extracto de la corteza de *R. mangle* y de las hojas de *B. karatas* inhibirán la gluconeogénesis hepática en la prueba de tolerancia a piruvato
- El extracto de la corteza de *R. mangle* y de las hojas de *B. karatas* inhibirán a la enzima glucosa-6-fosfatasa *in vitro*.



ANTECEDENTES

Diabetes mellitus

Se define a la diabetes mellitus (DM) como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por presentar hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, su acción o ambas. Dentro de esta patología se identifican cuatro tipos principales de esta enfermedad; diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes gestacional y otros tipos específicos (American Diabetes Association, 2014).

Diabetes mellitus tipo 1

Sus principales características son la presencia de hiperglucemia e insulinopenia (Zheng & Mathews, 2014). Esta enfermedad es considerada de carácter autoinmune, sin embargo, también puede deberse a otras causas y se denomina como DM1 idiopática.

Diabetes mellitus tipo 1 autoinmune

Este tipo de diabetes es la que presentan de un 5 -10% de las personas con DM, y anteriormente era conocida como diabetes de inicio temprano o insulinodependiente, y se produce por una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Entre los marcadores de la destrucción de las células β por inmunidad se encuentran los anticuerpos anti-célula β , anticuerpos anti-insulina y anticuerpos anti- tirosinas fosfatasas.

La destrucción autoinmune de las células β tiene numerosas predisposiciones genéticas, así como también se encuentra relacionada a factores ambientales, los cuales aún no se encuentran bien definidos (American Diabetes Association, 2014).

Diabetes mellitus tipo 1 idiopática

En algunos casos la etiología de DM1 es desconocida, ya que no se observan evidencias que sugieran la destrucción de células β mediada por inmunidad. Los pacientes de este rubro tienen una insulinopenia permanente, y por lo tanto son propensos a presentar cetoacidosis (American Diabetes Association, 2014).



Diabetes mellitus tipo 2

En este tipo de DM la característica distintiva es la presencia RI, sin embargo, también se encuentra asociada a una deficiencia en la secreción de esta hormona. La relevancia epidemiológica de la DM2, se debe a que del total de pacientes con DM, este subtipo abarca del 90-95% de los pacientes.

Diabetes gestacional

Este trastorno se define como intolerancia a la glucosa cuyo inicio o diagnóstico haya sido por primera vez durante el embarazo. La mayoría de los casos se revierten con el nacimiento, sin embargo, en ocasiones dicha intolerancia a la glucosa permanece una vez finalizado el periodo gestacional.

Otros tipos específicos

En esta categoría se incluyen aquellas afecciones que producen un aumento en los niveles de glucosa plasmática, entre los que se encuentran: a) defectos genéticos de la célula β , b) defectos genéticos en la acción de la insulina, c) enfermedades de páncreas exócrino, d) endocrinopatologías, e) diabetes inducida por agentes químicos, f) infecciones y g) otros síndromes genéticos asociados a diabetes.

Alteración en tolerancia a la glucosa y alteración de glucosa en ayuno

La alteración en tolerancia a la glucosa (IGT, por sus siglas en inglés) y la alteración de glucosa en ayuno (IFG, por sus siglas en inglés), son estados en los cuales los niveles de glucosa plasmática se encuentran por arriba de los niveles encontrados en gente sana, sin embargo, no son lo suficientemente elevados para que la persona sea considerada como diabética. Un aspecto importante es que el presentar IGT o IFG aumentan el riesgo de padecer DM2 o enfermedades cardiovasculares.

Diagnóstico

Para el diagnóstico de esta enfermedad se utilizan pruebas de laboratorio las cuales consisten en medir las concentraciones de glucosa. Entre esos exámenes se encuentran; la medición de los niveles en ayuno de glucosa (FPG), niveles de glucosa plasmática dos horas después de la ingesta de 75g de glucosa (OGTT), glucemia al azar y el porcentaje de hemoglobina glicada (HbA1c) (American



Diabetes Association, 2016) Los valores tanto normales como de personas con DM se muestran en la **tabla 1**.

Tabla 1. Parámetros de diagnóstico para diabetes mellitus. Muestra las pruebas y valores de glucosa plasmática normales, de intolerancia a la glucosa y diabéticos. Datos obtenidos de (American Diabetes Association, 2014)

	Glucosa en OGTT ayuno (FPG)		Glucosa al HbA1c azar	
Normal	<100mg/dL	<140mg/dL	No aplica	<5.6%
Intolerancia a glucosa	100-125mg/dL	140-199mg/dL	No aplica	5.7-6.4%
Diabético	>126mg/dL	>200mg/dL	>200mg/dL	>6.5%

Epidemiología

Esta patología es una de las emergencias globales que están presentes en el siglo XXI. En la actualidad se estima que 415 millones de personas a nivel mundial presentan esta enfermedad y se calcula que 318 millones de adultos presentan alteraciones en la tolerancia a la glucosa (International Diabetes Federation, 2015).

En el caso específico de Norteamérica y el Caribe, se tiene un aproximado de 44.3 millones de personas con DM, y las proyecciones indican que para el año 2040 ese número se incrementará a 60.5 millones, es decir, un aumento del 36.5% aproximadamente.

En cuanto a prevalencia, en el año 2015 se estimó un 8.8% a nivel mundial, pero las proyecciones arrojan que aumentará a 10.4% para el año 2040. En el caso de Norteamérica y el Caribe, la prevalencia fue de 12.9% y ésta alcanzará la cifra de 14.7%, convirtiendo a esta región en la que presenta una mayor prevalencia de la enfermedad.

Para México, el número de personas con DM es de 11.5 millones convirtiéndolo en el segundo país con más personas enfermas en Norteamérica, y la



prevalencia es mayor al 12%. Un punto importante, es que la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012 menciona que por cada paciente diagnosticado existe uno que aún no cuenta con diagnóstico.

En cuanto a la mortalidad, se estima que en 2015 murieron 5 millones de personas debido a la DM, lo cual coloca a esta enfermedad con un mayor porcentaje de muertes (14.5%) a nivel global si se compara con algunas enfermedades infecciosas. De las defunciones a causa de DM, el 46.6% fueron en personas menores a los 60 años. En el caso de la región de Norteamérica y el Caribe, las cifras arrojan que en 2015 fallecieron 324 mil personas, y el 38.3% de esas muertes fueron personas menores a 60 años.

Cabe mencionar que globalmente, 318 millones de personas presentan alguna alteración de tolerancia a glucosa, y en 2040 se estima que ese número aumente a 482 millones. El 50.1% de la gente que padece IGT tienen menos de 50 años de edad. La región de Norteamérica y el Caribe presenta una prevalencia de 15% de este padecimiento, siendo la zona con mayor porcentaje a nivel mundial.

Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2

Como se ha mencionado con anterioridad, la DM2 se caracteriza por presentar deficiencias en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, siendo resultado de la RI, y/o una deficiente secreción de la misma (DeFronzo et al., 2015).

A diferencia de la DM1, en la diabetes tipo 2 la RI se refiere a una reducción en la sensibilidad de los órganos lo cual conlleva a defectos metabólicos en el organismo a nivel de carbohidratos, proteínas y lípidos (Thomas, Zhang, & Mitch, 2015). La función de la insulina está dirigida a tres tejidos principales: hepático, muscular y adiposo. En el primero disminuye la producción de glucosa, en músculo aumenta la captación de ésta, y en adiposo reduce la liberación de ácidos grasos libres (**Figura 1**).

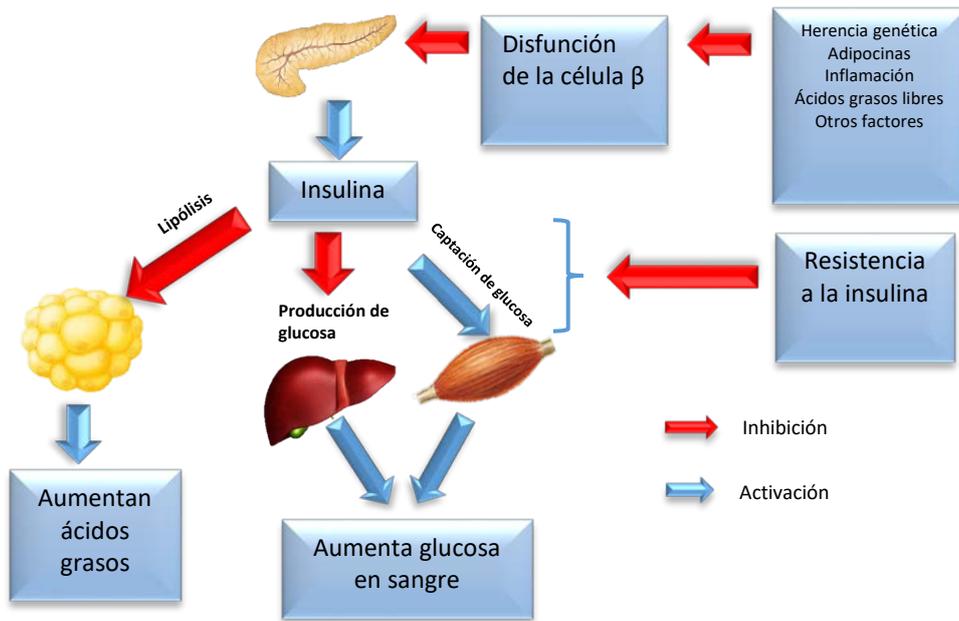


Figura 1. Fisiopatología de la diabetes mellitus. En caso de los adipocitos, se observa que la RI provoca la liberación de ácidos grasos, en músculo evita que la glucosa ingrese al miocito y en el hígado aumenta la producción de glucosa. Imagen modificada de Stumvoll, Goldstein, & van Haefen, 2005

Para que las acciones mencionadas anteriormente se lleven a cabo se requiere de la unión de la insulina con su receptor, el cual pertenece a la subfamilia de receptores con actividad de tirosina cinasa. Estos receptores son proteínas tetraméricas con dos sub-unidades β y dos α , siendo estas últimas las que cuentan con la función de cinasa (Saltiel & Kahn, 2001).

Al llegar la insulina a su receptor, se activa, de modo que fosforila las tirosinas, permitiendo la unión de los sustratos del receptor de insulina (IRS's). Una vez que se lleva a cabo esta interacción, p85 libera a la subunidad p110 la cual convierte el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3). La presencia de PIP_3 brinda un sitio de unión para proteínas cinasas de serina como PDK1 y PDK2, las cuales se encargan de activar a la proteína cinasa B o también conocida como Akt, la cual fosforila diferentes proteínas y con ello se llevan a cabo las diferentes funciones según el tejido celular en el que se active. Si se activa en adipocito y miocito permitirá la translocación de GLUT4 en la membrana celular para así aumentar la captación de glucosa, en el caso del tejido hepático evitará la producción de glucosa (**Figura 2**) (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008).

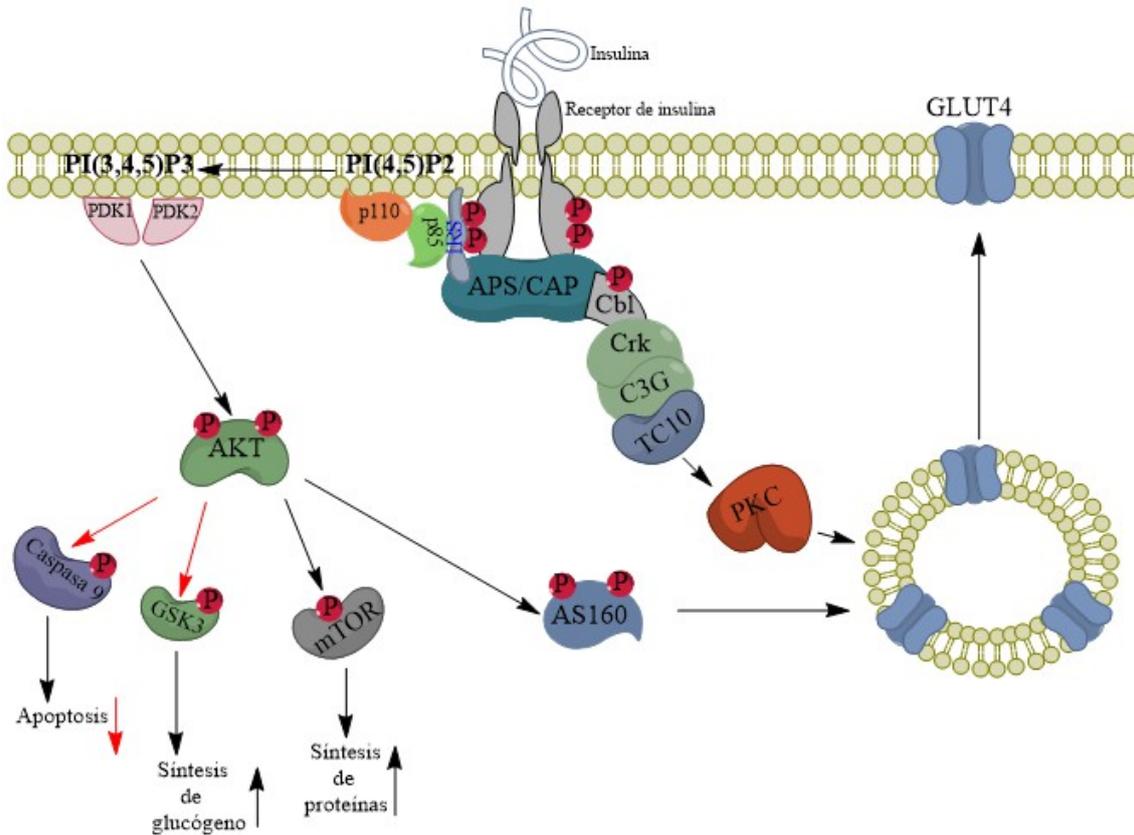


Figura 2. Señalización de la insulina en tejido sin resistencia. Se muestran las vías de transducción de señales que se activan al llevarse a cabo la unión de la insulina con su receptor. Las flechas negras indican activación, mientras que las flechas rojas indican inhibición.

En el caso de la DM2, como se mencionó anteriormente presentan resistencia a la insulina, y esta resistencia trae como consecuencia hiperglucemia, además de un deficiente manejo de los ácidos grasos.

La obesidad y la inactividad física están fuertemente asociadas a la RI. Algunos de los factores que se han identificado como causantes de dicha patología son algunas citosinas pro-inflamatorias y ácidos grasos libres.

Debido a que la señalización de la insulina requiere de la fosforilación de los IRS en tirosinas, algunos de los mecanismos moleculares por los cuales se presenta RI, es la presencia de fosfatasas (Fosfotirosina fosfatasa 1B) y por la fosforilación de los IRS en residuos de serina y treonina, bloqueando la cascada de señalización (**Figura 3**) (Stumvoll et al., 2005)

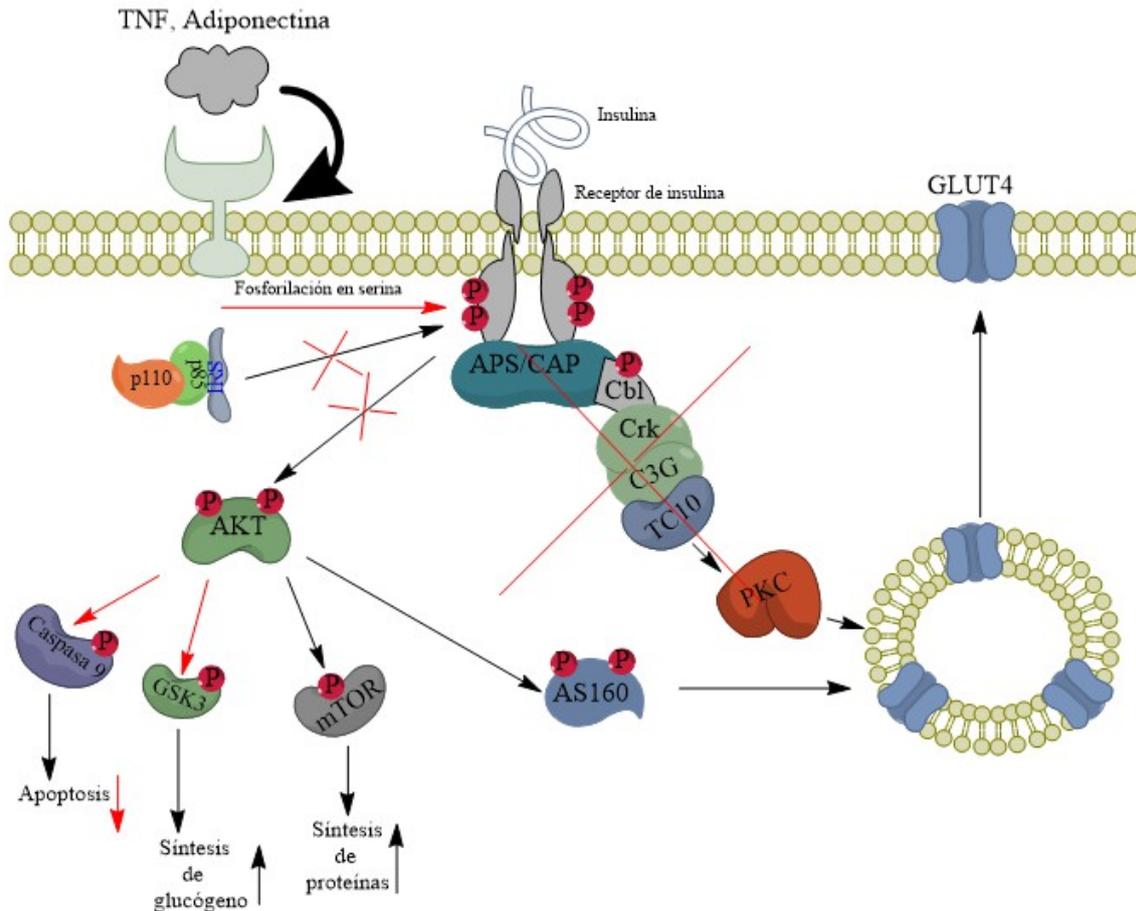


Figura 3. Señalización de la insulina en tejido con resistencia. Se muestra el mecanismo por el cual la adiponectina y el factor de necrosis tumoral (TNF) bloquean la cascada de señalización de la insulina. Las flechas negras indican activación, mientras que las flechas rojas indican inhibición.

Al presentarse dicha RI, el organismo no puede metabolizar bien los carbohidratos proteínas y lípidos, es por eso que el paciente diabético presenta altos niveles de colesterol y triglicéridos en sangre, además de hiperglucemia por la mala homeostasis de glucosa.

Homeostasis de la glucosa

La glucosa que se encuentra circulando en el torrente sanguíneo proviene de tres diferentes fuentes: 1) absorción intestinal de la dieta, 2) glucogenólisis y 3) gluconeogénesis.

La insulina y el glucagón son dos hormonas antagonistas que se encargan de dirigir a los tejidos periféricos para una tasa adecuada de producción y utilización de la glucosa, y de este modo lograr que la glucemia se mantenga en niveles normales (normoglucemia) (Sharabi, Tavares, Rines, & Puigserver, 2015).



El músculo y el tejido adiposo tienen la capacidad de utilizar diferentes sustratos para la obtención de energía, entre ellos se encuentran la glucosa, cetonas y ácidos grasos libres; la señal que determina el sustrato que se utilizará es la insulina. A bajos niveles de la hormona, los sustratos utilizados serán cetonas y ácidos grasos libres, y en consecuencia la cantidad de glucosa captada por los mismos se verá disminuida, mientras que, a altos niveles de insulina, el sustrato será la glucosa, con lo cual se aumenta el ingreso de la misma y con ello se almacenará en forma de glucógeno en el músculo y como triglicéridos en tejido adiposo (Bano, 2013).

Los factores importantes de la regulación de glucosa son: 1) la respuesta dada por hormonas como son la insulina, glucagón y catecolaminas; 2) la actividad del sistema nervioso simpático; 3) la concentración de ácidos grasos libres; 4) respuesta sostenida de hormonas como cortisol y hormona del crecimiento (Bano, 2013)

Glucagon

Es un péptido derivado del proglucagon, que se conforma de 29 residuos de aminoácidos, y es producido en las células α de los islotes pancreáticos. La función del glucagon es la regulación de la glucosa plasmática tras promover el aumento de la misma para mantener la normogluceemia cuando hay una alta demanda de este carbohidrato.

La acción del glucagon trae como consecuencia la ruptura del glucógeno hepático liberando glucosa a torrente sanguíneo. Otra función es la activación de la gluconeogénesis de sustratos como piruvato, lactato o alanina, con lo que se disminuye la glucólisis (Tan, 2014).

Insulina

Es una hormona de naturaleza proteica, la cual es sintetizada en las células β de los islotes pancreáticos. La insulina cuenta con una forma inmadura a la cual se le denomina "proinsulina", que sufre modificaciones y con ello se obtiene el polipéptido C y la insulina madura. La hormona madura está conformada por la cadena A (21 residuos de aminoácidos) y B (30 residuos de aminoácidos), y unidas entre sí mediante puentes disulfuro (Joshi, Parikh, & Das, 2007).



La principal función de la insulina es la regulación de los niveles de glucosa en el plasma. Asimismo, también se encarga de regular el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, así como de promover la división y el crecimiento celular a través de efectos mitogénicos (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008).

Regulación hepática de glucosa

Como se mencionó anteriormente, la insulina es una hormona fundamental para la regulación de los niveles de glucosa plasmática debido a que se encarga de inhibir la producción hepática de dicho carbohidrato a través de la inhibición de la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008). La glucogenólisis se refiere a la ruptura de glucógeno en glucosa (Sharabi et al., 2015). Debido a que el hígado tiene resistencia a la insulina, se presenta un aumento en la producción de glucosa por la vía de glucogenólisis y gluconeogénesis, siendo esta última la responsable del incremento de la glucemia en ayuno (DeFronzo et al., 2015), y por ello la importancia de conocer a fondo la vía metabólica, para así poder generar blancos terapéuticos que la inhiban.

Gluconeogénesis

Vía metabólica que es definida como la síntesis de glucosa a partir de precursores “no hexosas”. Se lleva a cabo principalmente en hígado, corteza renal y en menor grado en el intestino delgado. La gluconeogénesis utiliza como sustratos lactato, piruvato, propionato, glicerol y 18 de los 20 aminoácidos, excepto leucina y lisina (Hanson & Owen, 2013).

Esta vía metabólica es diferente a la glucólisis por algunas reacciones enzimáticas llevadas a cabo por enzimas reguladoras. Dichas enzimas son : piruvato carboxilasa (PC), fosfoenolpiruvato carboxicinasa (PEPCK), fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BisPasa) y glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), la cuales son inhibidas de forma transcripcional por la presencia de insulina (**Figura 4**) (Postic et al., 2004).

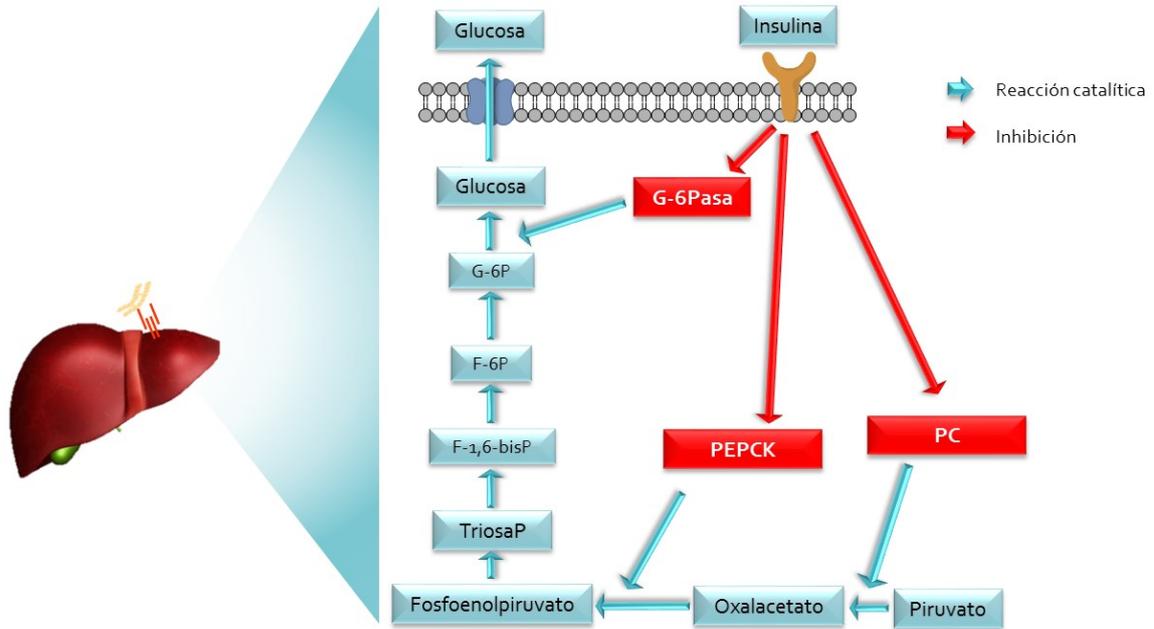


Figura 4. Papel de la insulina en la regulación transcripcional de las enzimas paso limitantes de la gluconeogénesis. Las flechas en color rojo indican la inhibición de la transcripción, mientras que las flechas azules indican la dirección de la reacción catalizada. Imagen modificada de Postic,C; Dentin,R y Girard,J. (2004).

La PC es una de las enzimas reguladoras de la gluconeogénesis, se encuentra en la mitocondria y es la encargada de llevar a cabo la reacción de piruvato a oxalacetato. La importancia de esta enzima radica en proporcionar el oxalacetato para que éste sea convertido a malato, y de esta forma pueda salir de la mitocondria, una vez en citoplasma el malato se transforma a oxalacetato y así se continua la ruta gluconeogénica.

La siguiente enzima reguladora es la PEPCK, la cual tiene dos isoformas, la mitocondrial (PEPCK-M) y la citosólica (PEPCK-C); sin embargo, aún no se tiene clara la importancia metabólica de tener ambas. La reacción catalizada por PEPCK es la conversión del oxalacetato en fosfoenolpiruvato, esta reacción utiliza GTP como fuente de energía. La regulación de la enzima es por medio de la hormona insulina, la cual disminuye los niveles de expresión de la misma.

Otra enzima reguladora es la F-1,6-BisPasa la cual se localiza en el citosol. Esta enzima convierte a la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato, liberando una molécula de fosfato. Esta enzima es regulada alostéricamente por AMP y por la F-2,6-Bisfosfato de manera negativa, mientras que altas concentraciones de ATP inducen la acción de dicha enzima (**Figura 5**) (Hanson & Owen, 2013)

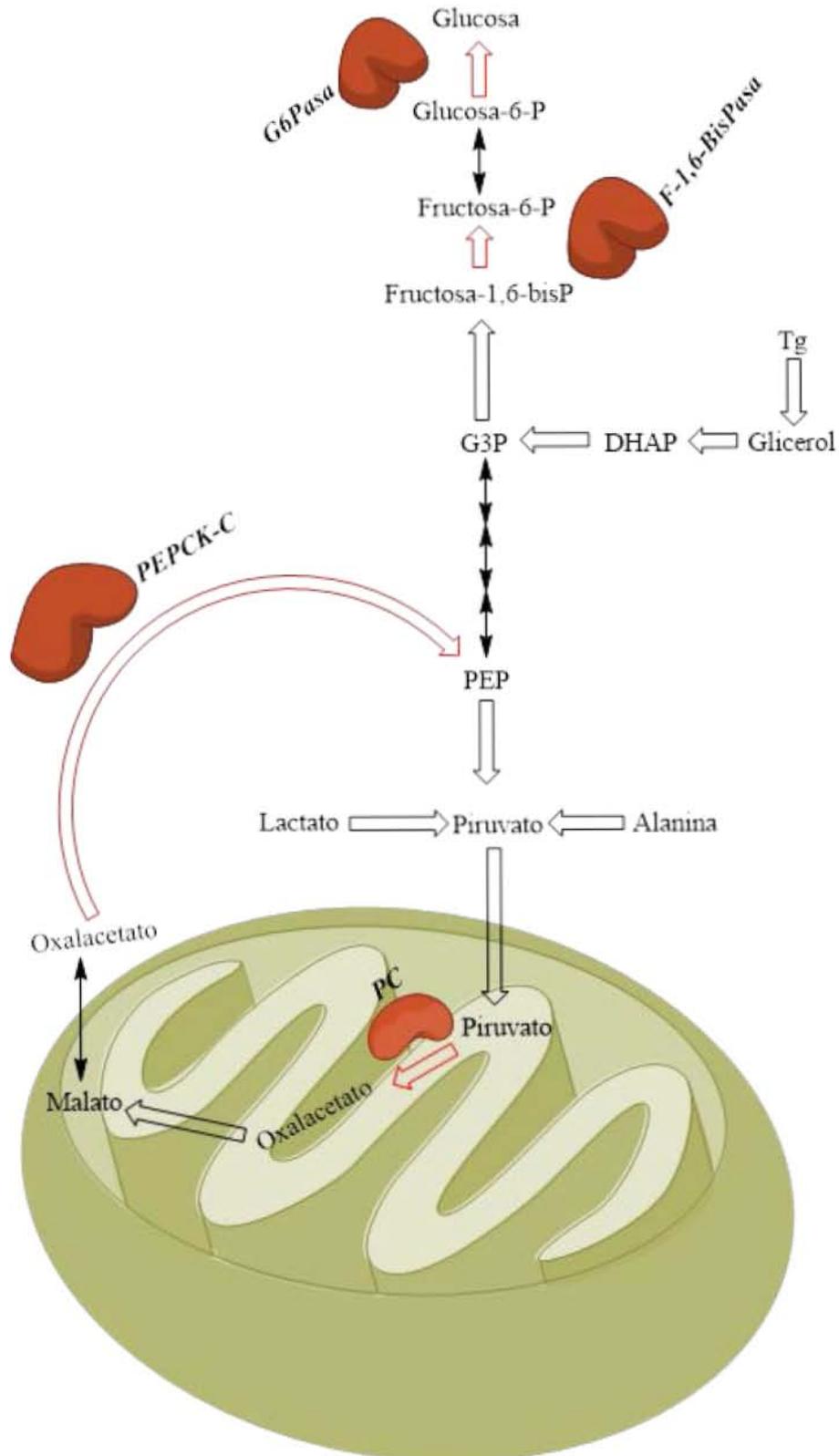


Figura 5. Esquema de gluconeogénesis. Se muestra algunos pasos de la vía metabólica. En rojo se observan las enzimas paso limitante de la gluconeogénesis.

Por último, se encuentra la G-6-Pasa, la cual se encuentra tanto en la vía metabólica de gluconeogénesis como en la glucogenólisis (Arion et al., 1997), y transforma a la glucosa-6-fosfato (G-6-P) en glucosa, de esta manera el monosacárido puede salir de la célula a torrente sanguíneo. A diferencia de otras fosfatasas, la G-6-Pasa se encuentra en el retículo endoplásmico, y cuenta con cuatro subunidades, tres de las cuatro son transportadores y una es la fracción catalítica (**Figura 6**) (van Schaftingen & Gerin, 2002).

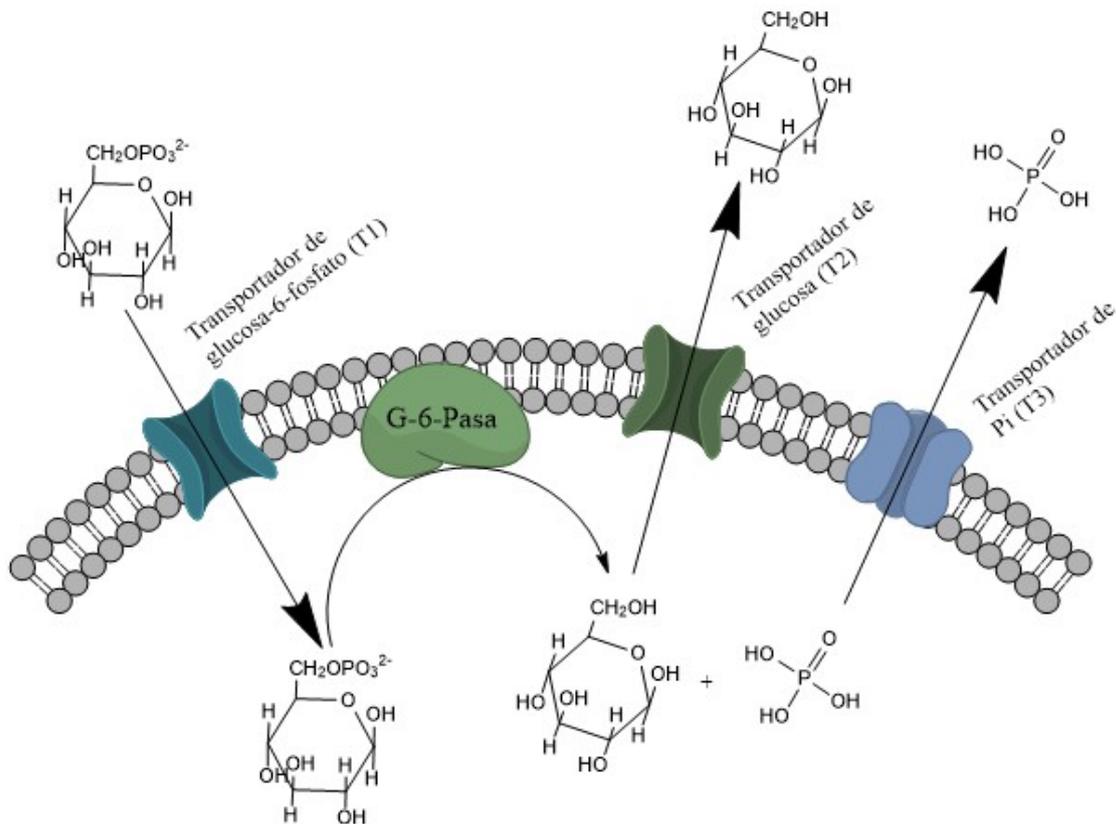


Figura 6. Esquema del complejo glucosa-6-fosfatasa. Se observan los tres transportadores

Propiedades G-6-Pasa

La G-6-Pasa es una enzima que utiliza como sustrato G-6-P; sin embargo, puede llegar a catalizar la hidrólisis de fosfato de diferentes sustratos, entre ellos se encuentra la manosa-6-fosfato. Esta selectividad se debe a la integridad que presentan los microsomas, ya que, si se encuentran en perfecto estado, la G-6-Pasa presenta una afinidad por G-6-P diez veces mayor que por manosa-6-fosfato.



Además de carbohidratos, esta enzima es capaz de hidrolizar sustratos como PPI, y carbamoil fosfato, siendo en este caso el pH un punto muy importante para direccionar la catálisis que realiza, ya que a un pH de 6.5 la enzima presenta la función de G-6-Pasa, mientras que, si la enzima está a un pH de 5, la reacción es de pirofosfatasa.

Inhibición del sistema G-6-Pasa

Un aspecto importante de esta enzima es que puede ser inhibida por sus productos, tanto por la glucosa como por el fosfato inorgánico. En el caso de la inhibición por glucosa se da de forma no competitiva, y es independiente de la presencia de detergentes, en cambio para el caso del Pi la inhibición es no competitiva para microsomas intactos, mientras que se vuelve competitiva con la presencia de detergentes (van Schaftingen & Gerin, 2002).

La inhibición de la G-6-Pasa también puede darse en el transportador de G-6-P, y en la lista de los inhibidores se encuentran: diazobenzeno sulfonato, el inhibidor de tripsina, floricina y ácido clorogénico (Arion et al., 1997).

La importancia del ácido clorogénico como inhibidor del transportador de G-6-P se debe a que es el mayor inhibidor de este complejo en la naturaleza tras ser producto del metabolismo secundario de plantas, además de que es de los inhibidores mejores caracterizados para dicho transportador, ya que el polifenol es un inhibidor competitivo reversible de dicho transportador (Charkoudian, Farrell, & Khosla, 2012).

Metformina

La liberación de glucosa por el hígado puede ser controlada por cuestiones endógenas, como la insulina o por agentes fitoquímicos como el ácido clorogénico. Otro ejemplo de sustancia que logra inhibir la producción de glucosa es la metformina, una biguanida hipoglucemiante oral derivada de la galegina, la cual es una guanida aislada de la planta *Galega officinalis* (Sośnicki, Kapral, & Węglarz, 2016).

La metformina es uno de los hipoglucemiantes con mayor efectividad. Posee dos mecanismos de acción, el primero es independiente del páncreas, el cual consiste en mejorar la sensibilidad a la insulina, y con esto se consigue un ahorro en dicha hormona. A diferencia de otros sensibilizadores a la insulina, este

hipoglucemiante oral no produce un aumento en el peso de los pacientes. El segundo mecanismo de acción consiste en inhibir la producción hepática de glucosa (Hardie, 2013).

El mecanismo molecular por el cual la metformina logra disminuir los niveles de glucosa en sangre aún no se tiene bien descrito, sin embargo, se sabe que disminuye la producción hepática de glucosa, así como la sensibilización a la insulina. Se sabe que la metformina inhibe al complejo I de la cadena de transporte de electrones, lo cual trae como consecuencia una disminución en los niveles de ATP, aumentando la concentración de AMP en citoplasma. El aumento de [AMP] activa a AMPK, la cual es una cinasa que aumenta la sensibilidad a la insulina. Por otro lado, el AMP inhibe la señal el glucagon al disminuir los niveles de AMPc, lo cual inhibe la transcripción de las enzimas gluconeogénicas (**Figura 7**) (Hardie, 2013).

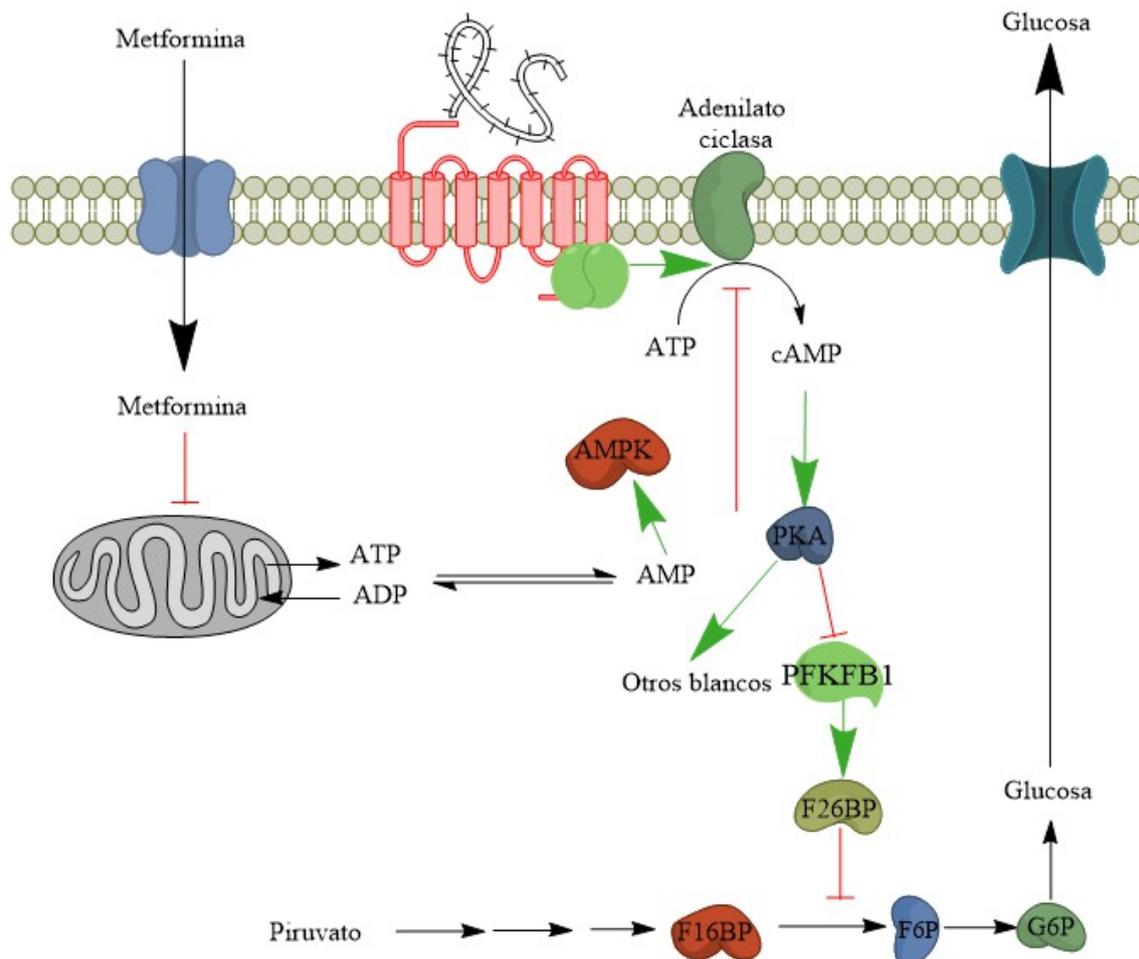


Figura 7. Mecanismo de acción del fármaco metformina. Las flechas negras del esquema indican activación, mientras que las líneas rojas indican inhibición.



Etnofarmacología

La etnofarmacología es una ciencia que es definida por Efron en 1970 como “la exploración científica interdisciplinaria de agentes biológicamente activos utilizados tradicionalmente por el hombre”. Esta definición se centra en la investigación de los usos; sin embargo, no hace énfasis al descubrimiento de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades (M Heinrich & Gibbons, 2001). Otra definición para esta ciencia es “El estudio de los usos tradicionales y productos naturales biológicamente activos con el objetivo de entender sus acciones terapéuticas” (Andrade-Cetto & Heinrich, 2011).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, tres cuartas partes de la población mundial utiliza remedios naturales (principalmente plantas) para el cuidado de la salud (Gilani & Atta-ur-Rahman, 2005).

A mediados del siglo XIX el 80% de los medicamentos fueron obtenidos de plantas medicinales, siendo ejemplos actuales algunos fármacos como: el ácido acetilsalicílico, la colchicina, la morfina, la pilocarpina, el taxol, entre otros (Gilani & Atta-ur-Rahman, 2005).

La etnofarmacología se encuentra particularmente floreciendo en países como Brasil, Rusia, Sudáfrica, Indonesia y México (Heinrich & Jäger, 2015). En lo que corresponde a nuestro país, las plantas medicinales son un elemento importante de los sistemas de salud indígena (Michael Heinrich, Ankli, Frei, Weimann, & Sticher, 1998).

Una de las principales metas de esta ciencia es verificar las actividades farmacológicas de los tratamientos etnomédicos, además de ser una fuente para la obtención de compuestos líder para el desarrollo de nuevos fármacos (Waller, 1993).

Hablando de la DM, es una patología que no puede ser diagnosticada por el médico tradicional, ya que requiere de la medición de los niveles de glucosa plasmáticos. Por eso mismo, la selección de las plantas que utilizan los pacientes diabéticos es realizada una vez que se tiene dicha diagnosis llevada a cabo por el médico (Andrade-Cetto, 2015), de modo que es una enfermedad en la cual el uso tradicional ha sido desarrollado hace décadas (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005).



Entre las plantas reportadas con efecto hipoglucemiante experimental en México se encuentran *Rhizophora mangle* (Rubalcaba, 2012) y *Bromelia karatas* (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013).

Rhizophora mangle L.

Clasificación taxonómica

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Malpighiales Juss. Ex Bercht. & J. Presl

Familia: Rhizophoraceae Pers.

Género: *Rhizophora* L

Especie: *Rhizophora mangle* L.

Esta especie cuenta con tres sinónimos, los cuales son *Bruguiera decangulata* Griff., *Rhizophora americana* Nutt. y *Rhizophora samoensis* (Hochr.) Salvoza

En la **Figura 8** se observa una foto de un ejemplar de herbario de la especie.

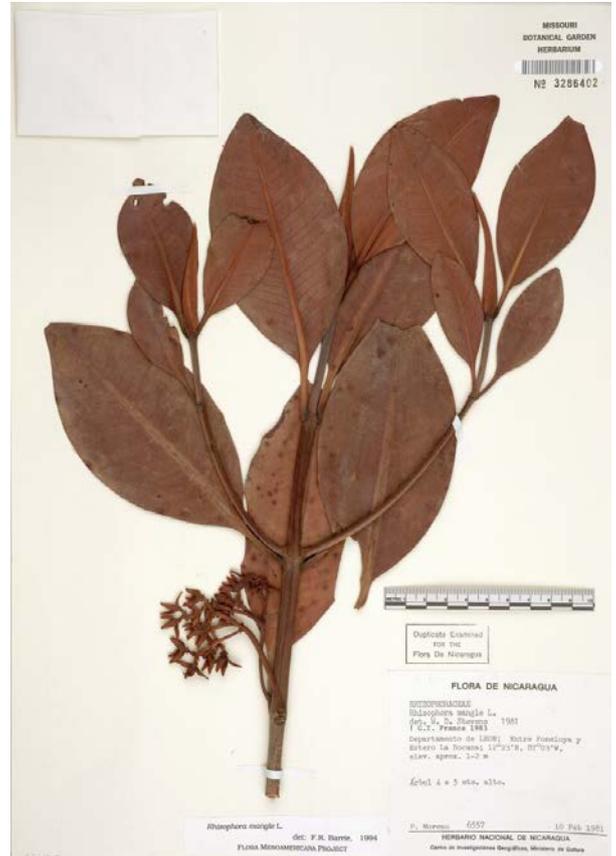


Figura 8. Ejemplar de herbario de *Rhizophora mangle*
Tomado de <http://www.tropicos.org/Image/31946>

Características morfológicas y antecedentes farmacológicos

Árbol que presenta una altura entre los 4 y 10 metros, y su tronco presenta numerosas raíces aéreas, las cuales pueden ser simples o ramificadas. La corteza presenta un color verde olivo pálido con manchas grises, sin embargo, si se realiza un corte a la misma se observa un color rojizo en el interior; por otro lado, presenta pequeñas rugosidades con apariencia fibrosa. Las hojas son simples, opuestas, pecioladas, redondeadas con forma elípticas, y se localizan en las puntas de las ramas, las cuales tienen un color verde oscuro en el haz, y en el envés son amarillentas. Las flores tienen un diámetro de 2.5 cm y presentan de 2 a 4 por pedúnculo, cuentan con 4 sépalos lanceolados, gruesos y coriáceos,



en cuanto a los pétalos son blanco amarillentos. El fruto que se observa en *R. mangle* es en forma de baya color pardo, coriáceo, duro y piriforme.

La distribución de *R. mangle* es a lo largo de toda la costa del país, distribuyéndose en diferentes estados como se muestra en la **figura 9** (CONABIO, 2015b).



Figura 9. Mapa de distribución de *Rhizophora mangle* en México. Se muestra la distribución de la especie a lo largo de la República Mexicana.

Los usos de *R. mangle* son múltiples por ejemplo, como material de construcción (CONABIO, 2015b) o uso medicinal. Entre los usos medicinales que se reportan se encuentra el tratamiento de diversas enfermedades del aparato digestivo como diarrea y disentería; así como para quitar dolor de muela, y para afecciones de la piel como lepra (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

R. mangle ha demostrado un efecto hipoglucemiante en conejos, en los cuales se administró una decocción acuosa del tallo a una dosis de 4 mg/Kg (Alarcon-Aguilara et al., 1998). Otro estudio demuestra el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso a dosis de 5.9 y 59 mg/Kg y etanol agua 9 y 90 mg/Kg de la



corteza de *R. mangle* en ratas hiperglucémicas inducidas con streptozotocina y nicotinamida (STZ-NA), dicho efecto hipoglucemiante se observa hasta por 3 horas posteriores a la administración del extracto (Andrade-Cetto & Rubalcaba-Mares, 2012). Posteriormente se realizó un estudio crónico en el cual se confirmó el efecto hipoglucemiante del extracto etanol agua de la corteza de *R. mangle* a dosis de 90 mg/Kg dando dos administraciones al día (Mata Torres Valle, 2014). En cuanto a otras especies del género *Rhizophora* con efecto hipoglucemiante, se encuentra *R. mucronata*, la cual su extracto acuoso muestra un efecto inhibitorio sobre las α -glucosidasas, mostrando una $IC_{50} = 3.3 \mu\text{g/ml}$ (Trinh, Staerk, & Jäger, 2016).

Bromelia karatas L.

Clasificación taxonómica

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Lillanae Takht.

Orden: Poales Small

Familia: Bromeliaceae Juss.

Género: *Bromelia* L.

Especie: *Bromelia karatas* L.

Esta especie cuenta con ocho sinónimos reportados: *Bromelia acanga* L., *Bromelia acaulis* Stokes, *Bromelia caratas* Hill, *Bromelia nudicaulis* var. *caragulata* Lam., *Bromelia plumieri* (E. Morren) L. B. Sm., *Karatas lagopus* E. Morren ex Devans., *Karatas plumieri* E. Morren. y *Nidularium karatas* (L.) Lwm. Ex Griseb.



Figura 10. Ejemplar de herbario de *Bromelia karatas*. Tomado de <http://www.tropicos.org/Image/33223>

Características morfológicas y antecedentes farmacológicos

Bromelia karatas es una planta terrestre que presenta un tamaño de 2 a 3 m en forma de roseta extendida, sus hojas coriáceas cuentan con un tamaño de 1.6 a



3.1m (**figura 10**). En cuanto a las hojas internas subyacentes de la rosera, su color va de rojizo a rojo-rosado. Las brácteas florales de 8 a 9 cm, oblanceoladas, densamente ferrugíneas, y la inflorescencia capitada unipinnada. Los sépalos miden 2.4- 3 cm. Su fruto son bayas de 6 a 8.7 cm de olor rosados (Naturalista, 2016).

B. karatas se encuentra en diferentes partes del país, sin presencia en el norte de México (CONABIO, 2015a) en bosques secos y húmedos en una altitud entre 400 y 1500 msnm (**Figura 11**) (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013)



Figura 11. Mapa de distribución de *Bromelia karatas* en México. Se muestran los estados en los que se encuentra la especie mencionada.

Entre los usos no medicinales de la especie *B. karatas* en México es la confección de cercas vivas, principalmente para impedir el paso de animales, debido a sus espinas y el fruto para la preparación de una bebida fresca.

Como antecedentes medicinales, se tiene que en el estado de Hidalgo se utilizan las hojas de *B. karatas* en infusión para la inflamación (Hornung-Leoni, 2011) y como hipoglucemiante (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013). En ese trabajo, se realizaron estudios *in vivo* en ratas STZ-NA, y así como la



identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de la planta. En un estudio crónico se observó que tiene efecto hipoglucemiante sostenido durante 42 días de administración del extracto acuoso de la planta (Sánchez Villaseñor, 2016).

Los resultados arrojaron que tanto el extracto etanol a dosis de 30 y 300 mg/Kg, como el extracto acuoso con dosis de 35 y 350 mg/Kg tienen un efecto hipoglucemiante, siendo este último el de mayor efecto. Las placas de cromatografía en capa fina muestran la presencia de seis flavonoides glucosilados en el extracto etanol-agua, mientras que solo se observaron 4 bandas en el extracto acuoso. En el caso de terpenos, se observan dos bandas tanto en el extracto etanol-agua como en el acuoso. Por último, no se detectaron alcaloides en ninguno de los dos extractos (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013).

Modelo STZ-NA

La inducción de este modelo propuesto por Masiello et al., 1998 consiste en la administración de streptozotocina (STZ) como agente citotóxico y la nicotinamida (NA) como un agente citoprotector.

La STZ cuenta con una fracción de glucosa, la cual es reconocida por el GLUT2 y de esa forma ingresa a la célula β pancreática, y la fracción de metilnitrosurea es la responsable de la toxicidad, generando una alquilación del DNA resultando en la fragmentación del mismo lo cual trae como consecuencia la sobre activación de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) reduciendo los niveles de NAD^+ y con ello depletando el ATP, teniendo como consecuencia la muerte celular (Szkudelski, 2012).

Como se mencionó con anterioridad, la NA es la molécula que cuenta con el efecto citoprotector, y esto se debe a dos funciones principales, la primera por la inhibición de PARP-1, y la segunda es por incrementar los niveles de NAD^+ evitando con eso una muerte celular por falta de ATP (Szkudelski, 2012).



Metodología

Colecta del material biológico

La corteza de *R.mangle* se colectó en la laguna de Manialtepec, Oaxaca, obteniéndose aproximadamente 5 Kg de la misma; además se elaboró un ejemplar de herbario, el cual se encuentra en el Herbario Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número IMSSM 15 816.

En el caso de las hojas de *B. karatas* la colecta fue realizada en el estado de Hidalgo, elaborándose un ejemplar de herbario el cual fue depositado en el Herbario Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número IMSSM 15 814.

Elaboración del extracto etanol-agua de R. mangle

El extracto etanol-agua se realizó colocando 20 g de la corteza seca y molida de en 250ml de etanol absoluto y 250 ml de agua destilada, calentándose a 40 °C y con agitación constante por cuatro horas. Posteriormente se filtró con papel filtro y vacío. El etanol fue removido con la ayuda de en un rotavapor Büchi® a presión reducida, y lo obtenido se ultracongeló a -40 °C para posteriormente liofilizarlo en liofilizadora LABCONCO® y obtener el extracto seco.

Elaboración del extracto acuoso de B. karatas

El extracto acuoso se realizó agregando 20 g de hojas molidas a 500 ml de agua destilada a 100 °C y se mantuvo en agitación por 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se filtró con papel filtro y vacío para ultracongelarse a -40 °C y ser liofilizado posteriormente para la obtención del extracto seco.

Cálculo de DER (Drug extract ratio)

El DER es la relación de la masa de la materia inicial (sustancia herbal) con la masa del extracto resultante (preparación herbal), el cual nos indica cuantas partes de la preparación herbal son necesarias para obtener una parte de la preparación herbal nativa. EL DER se puede ver influenciado por parámetros como son: la sustancia herbal inicial, el solvente utilizado en la extracción, el proceso de manufactura y los aparatos utilizados durante la extracción (Vlietinck, Pieters, & Apers, 2009).

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



Animales experimentales

Se utilizó un total de 77 ratas (hembras y machos) de la cepa Wistar, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Dichos animales fueron sometidos a fotoperiodos de 12 h /12 h de luz/oscuridad, además de contar con agua y alimento *ad libitum*.

Inducción del modelo STZ-NA

La inducción de la hiperglucemia se basó en lo reportado por Masiello et al., 1998, para la cual se utilizaron ratas con un peso aproximado de 200-250 g que fueron sometidas a un ayuno de 12 h. Posterior al ayuno se inyectó vía intraperitoneal (i.p.) una dosis de 150 mg/Kg de nicotinamida (NA), y transcurridos 15 minutos se administró en la vena caudal una dosis de 65 mg/Kg de estreptozotocina (STZ), tomándose como animales hiperglucémicos aquellos que presentaran niveles de glucemia >300 mg/dL.

Grupos experimentales

Los animales fueron asignados a siete grupos experimentales: control normoglucémico (N), control normoglucémico + piruvato (NP), control hiperglucémico (H), control hiperglucémico + piruvato (HP), control hiperglucémico + piruvato + metformina (HPM), experimental + piruvato + extracto etanol-agua de *Rhizophora mangle* (HPRm) y experimental + piruvato + extracto acuoso *Bromelia karatas* (HPBk) (**Tabla 2**).



Tabla 2. Grupos experimentales. Se enlistan los grupos experimentales, así como el tratamiento para cada uno (n=11).

Grupo	Tratamiento
Control normoglucémico (N)	Solución fisiológica
Control normoglucémico + piruvato (NP)	Piruvato (2 g/Kg)
Control hiperglucémico (H)	Solución fisiológica
Control hiperglucémico + piruvato (HP)	Piruvato (2 g/Kg)
Control hiperglucémico + P + metformina (HPM)	Piruvato (2 g/kg) y metformina (500 mg/Kg)
Experimental + P + <i>Rhizophora mangle</i> (HPRm)	Exto. EtOH-H ₂ O <i>R. mangle</i> (90 mg/Kg)
Experimental + P + <i>Bromelia karatas</i> (HPBk)	Exto. Acuoso <i>B. karatas</i> (218 mg/Kg)

Prueba de tolerancia a piruvato

Los animales se mantuvieron en ayuno por 18 h. Una vez transcurrido el ayuno se midieron los niveles iniciales de glucosa plasmática (T₀) obteniendo la muestra sanguínea de la vena caudal realizando un corte en la punta de la cola de la rata, y la muestra se analizó con el glucómetro *Accutrend® Plus* por duplicado. Una vez obtenidos los niveles de glucosa plasmática se administraron los tratamientos y se midió la glucemia en el tiempo 30, 60, 90, 120 minutos.

Obtención de microsomas

Se utilizó una rata Wistar macho que fue sometida a 18h de ayuno para la obtención de los microsomas que contienen a la enzima G-6-Pasa. Para la extracción el animal fue anestesiado con pentobarbital sódico (10 u/100 g de peso vía i.p). y se obtuvo el hígado que se perfundió con solución fisiológica.

El órgano obtenido se cortó en fragmentos de dos gramos los cuales se homogenizaron manualmente dando ocho golpes en un homogenizador dounce con un buffer de sacarosa 250 mM, 1 mM EDTA y 5 mM HEPES a pH de 7.4, el homogenado obtenido se filtró con una tela de nylon. Después del filtrado, se realizó una centrifugación diferencial a 1,000 g y a 12,000 g por 10 minutos cada



una. Por último, el sobrenadante post-mitocondrial fue centrifugado a 100,000 g por una hora. Los procedimientos se realizaron a 4 °C y el “pellet” obtenido se conservó ultracongelándolo a -40 °C, en un REVCO®.

Cinética de inhibición dosis-respuesta

El pellet con los microsomas se resuspendió en un buffer de sacarosa 250 mM e imidazol 40 mM con ayuda de un vórtex. Se realizó un ensayo de actividad de microsomas, en el cual se colocaron diferentes cantidades de los mismos (5, 10 y 15 µl) con la finalidad de seleccionar el volumen al cual se obtiene un nivel de actividad aproximadamente de una unidad de densidad óptica, para la realización de las curvas de inhibición. Para medir dicha actividad, se colocaron en un tubo de vidrio: buffer (50 µl), microsomas (5, 10 o 15 µl), agua destilada hasta completar un volumen de 90 µl, ácido clorogénico o el extracto a concentración seleccionada (0, 2, 5, 20, 50, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 y 12000 µg/ml) y por último G-6-P 20 mM (10 µl). La reacción se dejó llevar a cabo por 20 minutos a 20 °C. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo con 0.9 mL de solución de trabajo para Pi (0.42% Molibdato de Amonio, 10% de SDS y 10% de ácido ascórbico) y se incubó a 45 °C por 20 minutos. Finalizado el tiempo de incubación se midió la densidad óptica a 830 nm. El ensayo se realizó por duplicado y se utilizó un blanco, al cual se le adicionó la G-6-P después de la primera incubación

Análisis de resultados

Para las pruebas *in vivo* se analizaron por ANOVA de una vía y como prueba de comparaciones múltiples se utilizó *Tukey* con un valor de significancia de $p < 0.05$. Para la obtención de las IC_{50} se realizaron regresiones lineales y no lineales con el programa Graph Pad® Prism 6.



RESULTADOS

Cálculo de DER

Una vez realizado el cálculo del DER para ambos extractos, se obtuvo que para el extracto etanol-agua de *R. mangle* se requieren 3 partes de la preparación herbal para obtener una parte de la preparación herbal nativa; en el caso del extracto acuoso de *B. karatas* se obtiene un DER que nos indica que se necesitan 8 partes de la preparación para una parte de la preparación nativa (**Tabla 3**).

Tabla 3 Rendimiento de los extractos. Rendimiento del extracto etanol-agua de *R. mangle* y del extracto acuoso de *B. karatas*.

Extracto	Droga herbal	Preparación herbal	DER
<i>R. mangle</i> (EtOH-H ₂ O)	20 g	5.79 g	3:1
<i>B. karatas</i> (H ₂ O)	20 g	2.57 g	8:1

Prueba de tolerancia a piruvato

Como primer resultado se tiene la confirmación de la elevación de los niveles de glucosa plasmática al administrar piruvato vía intraperitoneal, ya que en todos los grupos tratados con dicho compuesto (tanto normoglucémicos como los hiperglucémicos) mostraron una elevación en los niveles de glucosa desde el T30.

En el caso del control normoglucémico (N) se observó como los niveles de glucosa se mantienen a lo largo de la prueba a pesar de las 18h de ayuno, mostrando un comportamiento lineal, mientras que en el grupo normoglucémico tratado con piruvato (NP) se observó un aumento significativo en los niveles de glucosa sanguínea al T30 al ser comparado contra su T0 y contra el grupo N en ese mismo tiempo (**figura 12**). Dicho aumento es sostenido a lo largo de los 120 minutos de la prueba si se realiza la comparación contra el T0, sin embargo, al tratarse de un organismo normoglucémico al observar la **figura 12** se aprecia que los niveles de glucosa muestran una tendencia a disminuir, ya que en el T120 no hay diferencias significativas contra el grupo N.



Al igual que N, el grupo hiperglucémico (H) también tiene un comportamiento lineal a lo largo de los 120 minutos de la prueba, demostrando que a pesar del ayuno el modelo STZ-NA es adecuado para este tipo de experimentos, ya que la hiperglucemia se mantiene en los animales experimentales.

Al administrar piruvato en el grupo hiperglucémico + piruvato (HP) se da un aumento significativo en la glucosa circulante, la cual se observó desde el T30 y se mantiene hasta el T120 al compararlo contra su T0. Un punto contrastante del grupo NP y el grupo HP, es que en el último no se muestra una tendencia a disminuir los niveles de glucosa debido a la afección de las células β pancreáticas, ya que en este caso las diferencias significativas respecto a su grupo control (H) se mantienen a lo largo de 120 minutos.

Como muestra la **tabla 4**, el grupo tratado con metformina (HPM) no presentó una elevación de los niveles de glucosa plasmática a pesar de la administración de piruvato, no hay diferencias significativas del T0 al compararlo contra su T30 y, aunque ninguno de los tiempos restantes muestra diferencias respecto al tiempo inicial, se observa una tendencia a disminuir la glucemia. El efecto hipoglucemiante del fármaco es evidente a lo largo de los 120 minutos de la prueba, ya que en ningún momento se elevan los niveles de glucosa y son diferentes de manera significativa al compararlos con el grupo control HP.

Tabla 4. Valores medios de glucosa plasmática \pm SEM en prueba de tolerancia a piruvato. Se muestran los valores medios \pm Error estándar de los valores de glucosa a los diferentes tiempos de medición y bajo los diferentes tratamientos. 1) Diferencias entre los grupos "a" Diferencia significativa ($p < 0.05$) vs H. "b" Diferencia significativa ($p < 0.05$) vs N. "c" diferencia significativa ($p < 0.05$) vs HP; 2) * diferencia significativa ($p < 0.05$) vs su T0

GRUPO (N=11)	GLUCOSA (mg/dl)				
	T0	T30	T60	T90	T120
N	120 \pm 2	121 \pm 3	113 \pm 3	112 \pm 4	110 \pm 2*
NP	118 \pm 3	178 \pm 8 ^{b*}	176 \pm 6 ^{b*}	159 \pm 6 ^{b*}	145 \pm 5*
H	194 \pm 8 ^b	202 \pm 11 ^{bc}	212 \pm 15 ^{bc}	204 \pm 15 ^{bc}	203 \pm 17 ^{bc}
HP	194 \pm 10	333 \pm 24 ^{a*}	340 \pm 21 ^{a*}	343 \pm 20 ^{a*}	334 \pm 19 ^{a*}
HPM	189 \pm 5	232 \pm 22 ^c	194 \pm 22 ^c	168 \pm 22 ^c	141 \pm 19 ^c
HPRm	187 \pm 5	273 \pm 14 ^{c*}	292 \pm 14 ^{c*}	290 \pm 11 ^{c*}	301 \pm 10*
HPBk	191 \pm 4	322 \pm 11*	335 \pm 13*	343 \pm 12*	336 \pm 13*



En la **figura 12** se observan los grupos control descritos previamente, y se muestra el diferente comportamiento que tienen debido al tratamiento recibido en el protocolo experimental.

En el caso de *R. mangle*, se observa que al hacer las comparaciones del T0 respecto a los demás, la administración del extracto etanol-agua de *R. mangle* no impide el aumento de los niveles de glucosa plasmática, ya que existe una diferencia significativa del T0 contra el T30, y dichas diferencias se mantienen a lo largo de los 120 minutos de la prueba, habiendo una mayor elevación de los niveles de glucosa en el intervalo T90 y T120, dicho comportamiento es muy importante para el análisis respecto al grupo HP (**Figura 12**).

A pesar de lo mencionado anteriormente, se puede inferir que el extracto etanol-agua de *R. mangle* muestra un efecto inhibitorio sobre la gluconeogénesis hepática, y esto se observa al comparar el T30 de HPRm contra el mismo tiempo del grupo Hp, en el cual se observan diferencias significativas. Dicho hallazgo indica que la administración de *R. mangle* inhibe la vía metabólica. Estas diferencias entre los dos grupos se mantienen a lo largo de 60 minutos, ya que en el T120 no se observa una diferencia debido a que los niveles de glucosa presentes en HPRm al T120 muestran un incremento.

En el caso del grupo experimental de *B. karatas*, no se observa ningún efecto de inhibición sobre la gluconeogénesis, ya que al administrar piruvato se presenta un incremento en los niveles de glucosa plasmática, este aumento es significativo si se compara contra su T0. En lo que corresponde a los demás tiempos (T60, T90 y T120) la diferencia contra el tiempo inicial se mantiene, de modo que no se puede hablar de un efecto inhibitorio de gluconeogénesis por parte del extracto acuoso de *B. karatas*.

Otro aspecto que determina que no hay efecto inhibitorio sobre la vía metabólica por parte del extracto acuoso de *B. karatas* es que no hay una diferencia significativa entre este grupo y el control HP en ninguno de los cuatro tiempos de medición posteriores a la administración de los tratamientos, y el comportamiento de los niveles de glucosa es prácticamente el mismo (**figura 12**).



En la **figura 12** se observa el comportamiento de los grupos experimentales junto con el grupo HP. En esta gráfica puede apreciarse como HPRm se encuentra por debajo de los valores de HP, y por tal motivo se puede hablar de un efecto inhibitorio del extracto de *R. mangle*. En el caso de HPBk, se observa que no hay diferencias al compararlo con el grupo HP en ninguno de los tiempos.

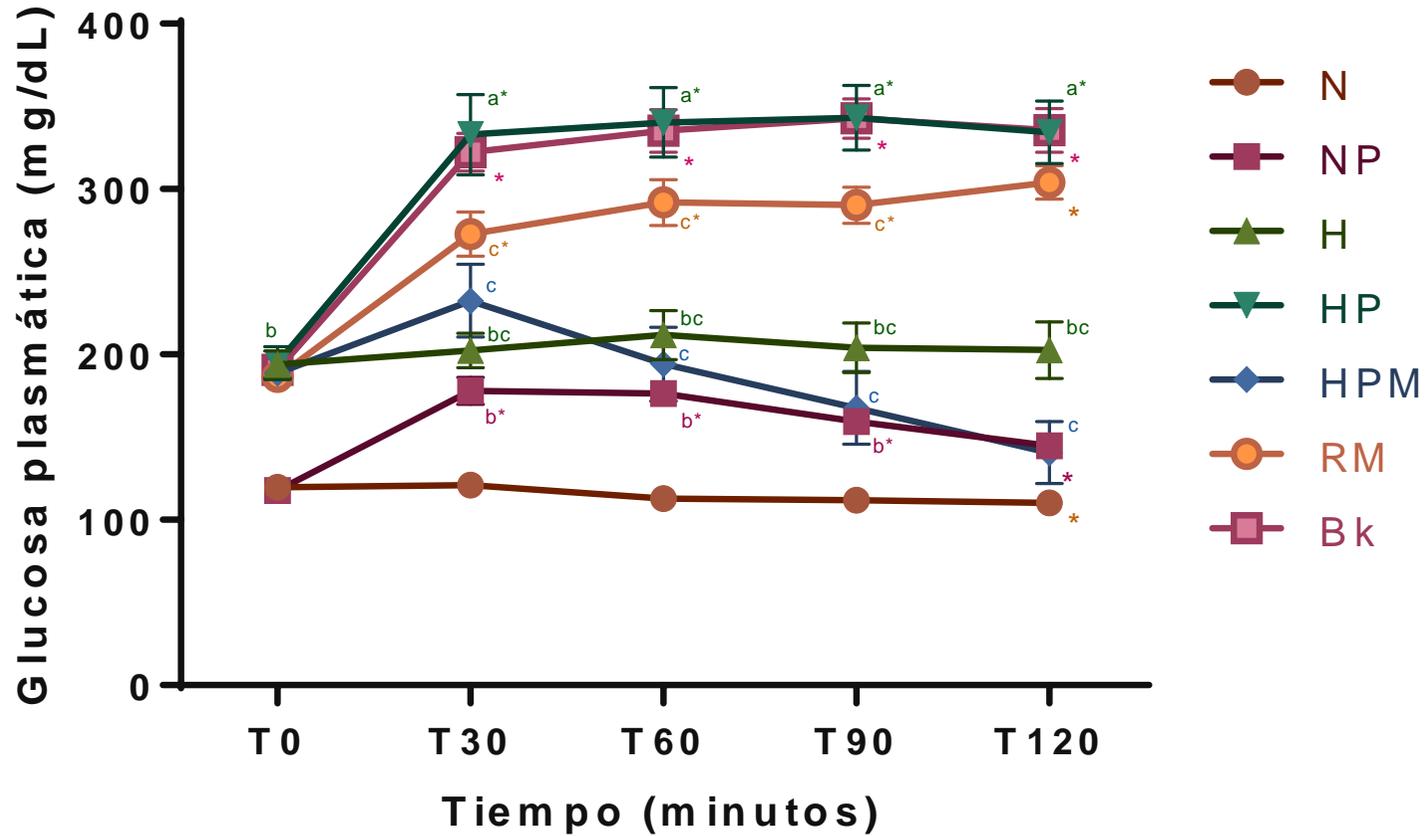


Figura 12. Gráfica de los valores medios de glucosa plasmática en prueba de tolerancia a piruvato. Se muestran los valores medios \pm Error estándar de los valores de glucosa a los diferentes tiempos de medición y bajo los diferentes tratamientos. Se muestran los valores medios \pm Error estándar de los valores de glucosa a los diferentes tiempos de medición y bajo los diferentes tratamientos. 1) Diferencias entre los grupos “a” Diferencia significativa ($p < 0.05$) vs H. “b” Diferencia significativa ($p < 0.05$) vs N. “c” diferencia significativa ($p < 0.05$) vs HP; 2) * diferencia significativa ($p < 0.05$) vs su T0.



Análisis área bajo la curva

Otro análisis realizado a este experimento fue obtener el área bajo la curva (AUC) por cada organismo presente en cada grupo, de este modo se puede tener un análisis de la glucemia a lo largo de toda la línea temporal del experimento.

En la **tabla 5** se muestran los valores del área bajo la curva calculados para los distintos grupos, los cuales muestran un comportamiento similar al observado en el análisis del curso-temporal. La administración de piruvato aumenta los niveles de glucosa plasmática, y eso se observa en el grupo NP y HP, los cuales si se comparan con N y H respectivamente muestra una diferencia estadísticamente significativa.

El otro grupo importante a destacar es el control positivo (HPM) el cual también muestra una diferencia significativa al compararse contra el grupo HP, lo cual nos confirma la inhibición de la producción de glucosa por medio de la gluconeogénesis por la metformina.

Tabla 5. Valores medios del área bajo la curva \pm SEM de prueba de tolerancia a piruvato. + diferencia significativa vs N, * diferencias significativas vs H y "a" diferencias significativas vs HP ($p < 0.05$).

GRUPO	ÁREA BAJO LA CURVA
N	13,788 \pm 200
NP	19,328 \pm 415 ⁺
H	24,468 \pm 1,107
HP	38,145 \pm 1,564 [*]
HPM	22,725 \pm 1,537 ^a
HPRM	32,708 \pm 788 ^a
HPBK	37,880 \pm 859



En cuanto a los grupos experimentales el extracto de etanol-agua *R. mangle* muestra una disminución significativa en el AUC, al ser comparado contra el control HP, lo cual es un indicador de que es un inhibidor de gluconeogénesis en la prueba de tolerancia a piruvato.

Por el contrario, el extracto acuoso de *B. karatas*, no presenta una disminución en ese parámetro al compararse contra HP, de modo que el efecto hipoglucemiante de este extracto no está dado por esta vía metabólica en la prueba de tolerancia a piruvato (**Figura 13**).

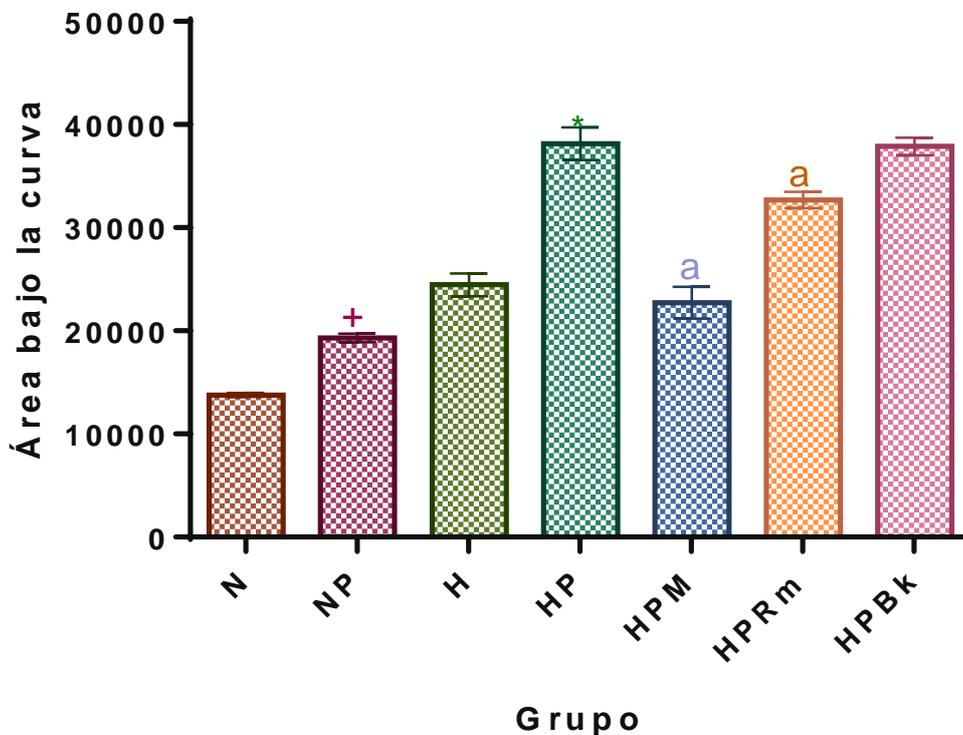


Figura 13. Gráfica de áreas bajo la curva de pruebas de tolerancia a piruvato. + diferencia significativa vs N, * diferencias significativas vs H y "a" diferencias significativas vs HP ($p < 0.05$).

Cinética enzimática de Glucosa-6-Fosfatasa

Se realizaron pruebas de cinética enzimática para medir la actividad de la G-6-Pasa, y los valores de las densidades ópticas para cada tratamiento se muestran en la **tabla 6**.



En el caso del control utilizado (ácido clorogénico) se observa una inhibición total de la actividad de la enzima, siendo su IC₅₀ de 62 µg/ml. Dicha IC₅₀ fue calculada por medio de una regresión lineal, cuya ecuación es:

$$y = -0.2062x + 0.8847$$

Como se observa en la **figura 14**, la coloración azul que indica la liberación de fosfato inorgánico, va disminuyendo al igual que la densidad óptica (**Tabla 6**) conforme aumenta la concentración de ácido clorogénico, lo cual muestra la disminución en la actividad enzimática.

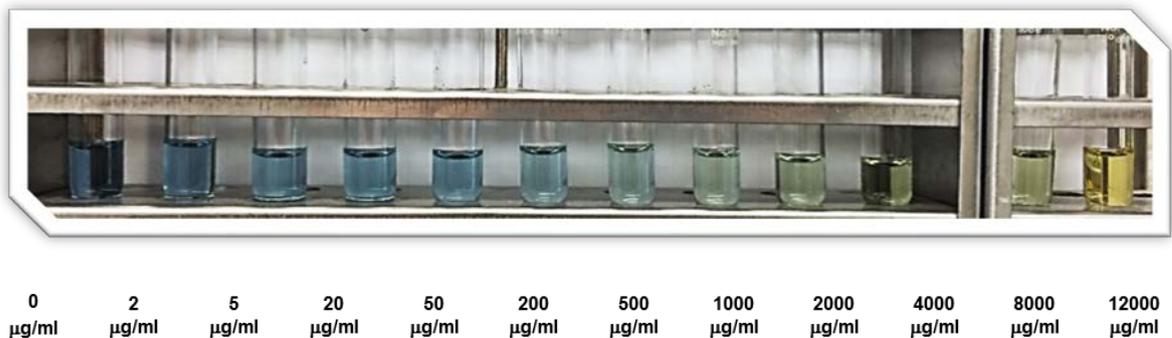


Figura 14. Fotografía del ensayo de inhibición de la G-6-Pasa del ácido clorogénico. Se observa la disminución de coloración azul al aumentar las concentraciones de ácido clorogénico, lo cual indica una disminución en la actividad de la enzima G-6-Pasa

En el caso de los extractos de las plantas, *R. mangle* es la planta que muestra una mejor actividad inhibitoria de la G-6-Pasa, ya que logra una inhibición de la enzima al ser tratada con una concentración de 12,000 µg/ml siendo su IC₅₀ equivalente a 99 µg/ml (**Figura 17**).

Para el caso del extracto etanol-agua de *R. mangle* la disminución en la coloración azul se observa en la concentración 200µg/ml (**Figura 15**), lo cual coincide con la IC₅₀ calculada por medio de la regresión no lineal, cuya ecuación corresponde a un modelo de cuatro parámetros y es la siguiente:

$$y = \frac{0.003 + (1.193 - 0.003)}{1 + 10^{(LogIC_{50}-x)(0.2203)}}$$

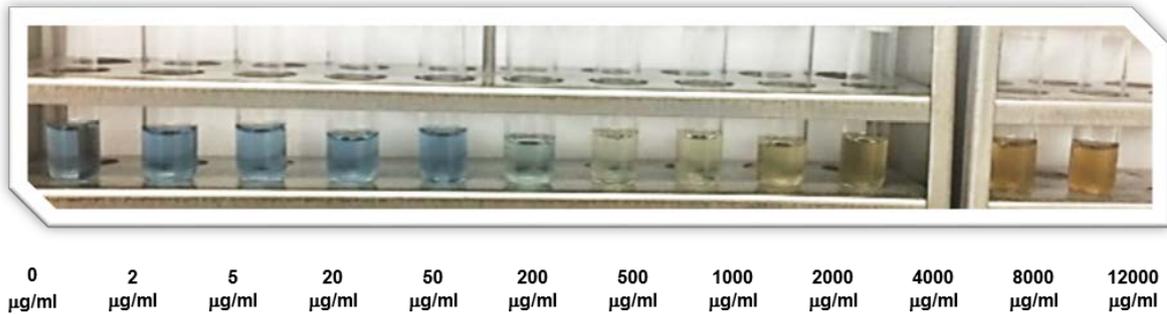


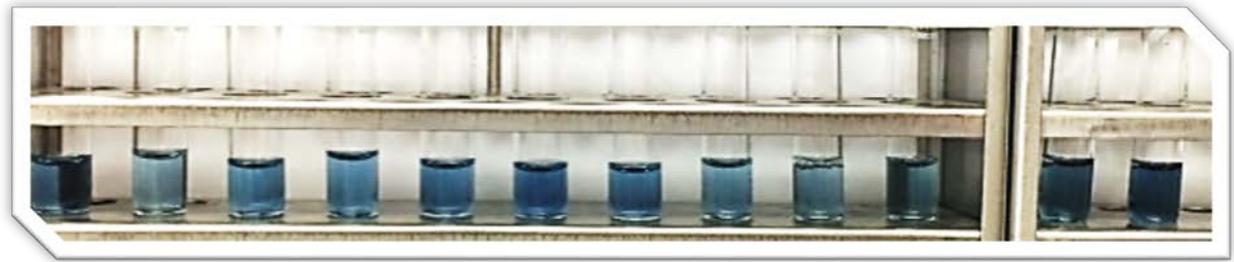
Figura 15. Fotografía del ensayo de inhibición de la G-6-Pasa del extracto de *R. mangle*. Se observa la disminución de coloración azul al aumentar las concentraciones del extracto de *R. mangle*, lo cual indica una disminución en la actividad de la enzima G-6-Pasa

Este resultado es equiparable a lo observado en las pruebas *in vivo*, ya que en dicha prueba muestra un efecto inhibitorio de la producción de glucosa hepática al inyectar piruvato al organismo.

El extracto acuoso de *B. karatas* al contrario de lo observado con el extracto etanol-agua de *R. mangle*, la IC_{50} es mayor (**Tabla 6**). Para el cálculo de la IC_{50} , se utilizó una regresión no lineal con un modelo de cuatro parámetros, la cual dio como resultado la siguiente ecuación:

$$y = \frac{0.1568 + (1.331 - 0.1568)}{1 + 10^{(LogIC_{50}-x)(-2.177)}}$$

En la **figura 16** se observa un aumento en la coloración azul, sin embargo, dicha coloración es producto del mismo extracto de *B. karatas*, de modo que su alta IC_{50} convierte a este tratamiento en una opción poco viable, ya que como se mostró anteriormente el efecto *in vivo* es nulo.



0 2 5 20 50 200 500 1000 2000 4000 8000 12000
 $\mu\text{g/ml}$ $\mu\text{g/ml}$

Figura 16. Fotografía del ensayo de inhibición de la G-6-Pasa del extracto de *B. karatas*. Se observa un aumento en la coloración azul, sin embargo, dicho aumento está dada por el mismo color del extracto, al restar el blanco, se obtiene el valor de D.O. correcto el cual indica una disminución en la actividad de la enzima G-6-Pasa

Tabla 6. Valores medios de la densidad óptica \pm SEM en curvas concentración inhibición de G-6-Pasa.

CONCENTRACIÓN ($\mu\text{G/ML}$)	ÁC. CLOGRÉNICO ($\text{IC}_{50} = 62 \mu\text{g/ml}$)	<i>Rhizophora mangle</i> ($\text{IC}_{50} = 99\mu\text{g/ml}$)	<i>Bromelia karatas</i> ($\text{IC}_{50} = 1,136\mu\text{g/ml}$)
	D.O	D.O	D.O
0	1.028 \pm 0.189	1.152 \pm 0.122	1.401 \pm 0.077
2	0.800 \pm 0.069	1.308 \pm 0.055	1.040 \pm 0.107
5	0.737 \pm 0.085	1.174 \pm 0.101	1.442 \pm 0.085
20	0.624 \pm 0.122	1.046 \pm 0.086	1.214 \pm 0.295
50	0.646 \pm 0.041	0.963 \pm 0.130	1.433 \pm 0.082
200	0.480 \pm 0.042	0.264 \pm 0.026	1.470 \pm 0.316
500	0.299 \pm 0	0.018 \pm 0.019	1.120 \pm 0.115
1000	0.215 \pm 0.058	0.010 \pm 0.003	0.821 \pm 0.039
2000	0.098 \pm 0.025	0.024 \pm 0.009	0.430 \pm 0.033
4000	0.186 \pm 0.030	0.029 \pm 0.021	0.257 \pm 0.056
8000	0.133 \pm 0.054	0.015 \pm 0.040	0.146 \pm 0.008
12000	-0.026 \pm 0.022	0 \pm 0.039	0.161 \pm 0.037

En la **figura 19**, se muestra el comportamiento gráfico de las curvas de inhibición dosis-respuesta, en la cual se hace evidente la eficacia de los tres tratamientos, sin embargo, se muestra que los tratamientos más potentes para obtener una inhibición de la enzima G-6-Pasa, es el ácido clorogénico, seguido por el extracto ETOH de *R. mangle*.

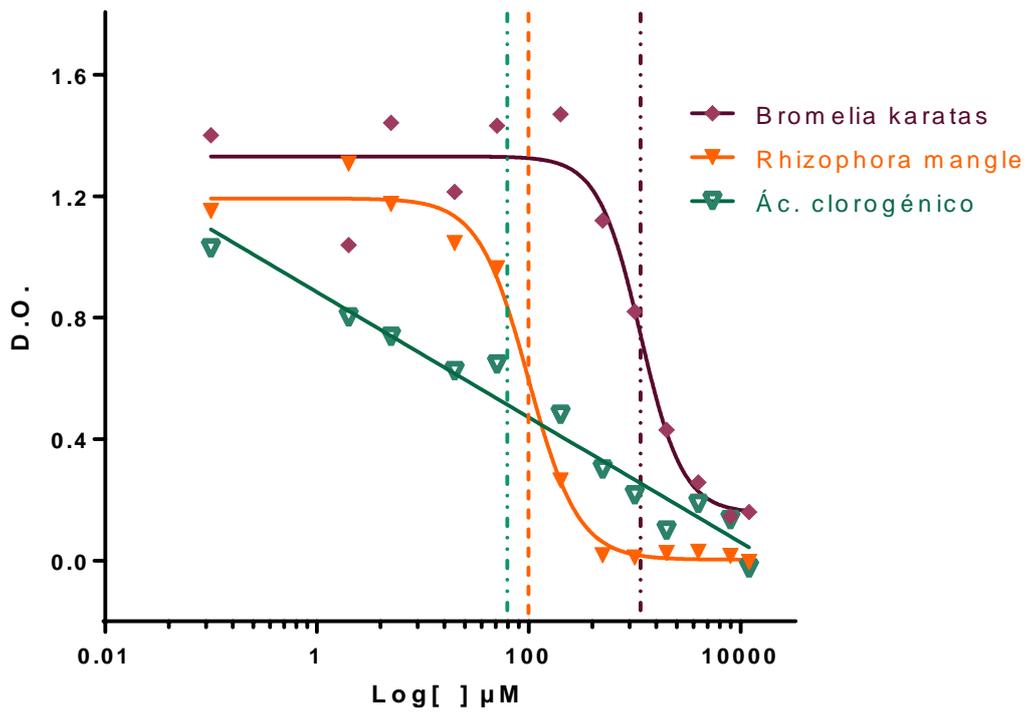


Figura 17. Gráfica concentración-inhibición de la G-6-Pasa. Se muestra la curva de concentración inhibición de la enzima G-6-Pasa, las líneas indican el log de la IC_{50}



Discusión

Como se mencionó en los resultados, el extracto acuoso de *B. karatas* no evita el aumento de la glucosa plasmática tras la administración intraperitoneal de piruvato, a pesar de tener un efecto hipoglucemiante comprobado de manera previa en estudios agudos (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013) y de forma crónica (Sánchez Villaseñor, 2016).

Con esa información se puede inferir que el mecanismo por el cual el extracto de *B. karatas* disminuye la glucosa plasmática es independiente a la inhibición de la gluconeogénesis, quedando por descartar otros posibles mecanismos por los cuales se pueda producir una disminución de los niveles de glucosa plasmática, tales como secreción de insulina, aumento en captación de glucosa por músculo y/o adipocito, o incluso una mayor excreción de glucosa por medio de la orina.

En cuanto a la inhibición alostérica de la G-6-Pasa, el extracto de *B. karatas* sólo logra disminuir la actividad catalítica en un 89% a pesar de utilizarse una concentración de 12,000 µg/ml, por eso mismo la IC₅₀ tiene un valor elevado (1,136 µg/ml). Con este resultado se puede descartar también un posible efecto sobre el último paso de la ruptura de glucógeno, ya que la G-6-Pasa es una enzima que se encuentra en ambas vías metabólicas.

En lo correspondiente al extracto etanol agua de *R. mangle* en la prueba de tolerancia a piruvato se observa un efecto de inhibición sobre la gluconeogénesis, ya que muestra diferencias significativas al compararse contra su control desde el T30 hasta el T90, siendo el T120 el único que no muestra dicha diferencia. La pérdida de la significancia en el último tiempo se debe a que se observa un aumento en los niveles de glucosa plasmática, lo cual nos puede indicar algunas cuestiones de farmacocinética de los metabolitos presentes en dicho extracto.

Una de las cuestiones de farmacocinética que podrían estar implicadas en la disminución del efecto hipoglucemiante producido por el extracto etanol-agua de *R. mangle* es la vida media de los compuestos presentes, de modo que se



sugiere realizar estudios sobre las concentraciones de dichos metabolitos en sangre, así como la duración de los mismos en la circulación sanguínea, de modo que así se podría tener una adecuada dosificación y administración de dicho extracto para que el efecto del mismo se observe por más tiempo.

Cabe destacar que el efecto inhibitorio del extracto de *R. mangle* sobre la gluconeogénesis en la prueba de tolerancia a piruvato, es consistente y significativo a pesar de la dispersión de datos que se observa, la cual es producto de la inducción de hiperglucemia por medio del modelo STZ-NA. Un aspecto importante de los modelos animales es que no logran reproducir la totalidad de la fisiopatología de la enfermedad en cuestión, debido a que solo presentan algunas alteraciones metabólicas, motivo por el cual la dispersión de los datos aumenta con la simple inducción del modelo de hiperglucemia, lo cual se observa en el aumento en el error estándar en los grupos hiperglucémicos independientemente de tratamiento que reciban.

En la cinética de inhibición se observa que el extracto de *R. mangle*, logra disminuir en su totalidad la actividad enzimática de la G-6-Pasa, y además tiene una IC₅₀ similar a la obtenida en el caso del ácido clorogénico, lo cual permite inferir que el mecanismo de acción de *R. mangle* como hipoglucemiante es la inhibición de la liberación de glucosa por parte del hígado.

En el ensayo se utilizaron microsomas hepáticos intactos, lo cual se puede asegurar ya que el ácido clorogénico logró inhibir la actividad catalítica de la G-6-Pasa, y es un inhibidor del transportador T1 del complejo G-6-Pasa (Arion et al., 1997), de tal forma que el extracto de *R. mangle* podría estar actuando de igual forma sobre algún transportador del complejo enzimático, sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que logre inhibir a la fracción catalítica de dicho complejo, para lo cual podrían utilizarse microsomas con membranas no intactas y así la sub-unidad catalítica quede expuesta, para interactuar libremente con su sustrato y los metabolitos presentes en el extracto etanol-agua.



Es importante destacar la importancia de la medicina tradicional, ya que gracias a ella se pueden obtener plantas que tengan efecto terapéutico hacia alguna patología, como en este caso se tiene *R. mangle* y *B. karatas*, son útiles para la DM2 ya que las cuales presentan efectos hipoglucemiantes demostrados (Andrade-Cetto & Medina-Hernández, 2013; Andrade-Cetto & Rubalcaba-Mares, 2012). Posteriormente el uso de técnicas químicas ayudaría a aislar o sintetizar el o los compuestos que sean activos, y así lograr obtener un fitomedicamento.



Conclusiones y perspectivas

El extracto acuoso de *B. karatas* no muestra una inhibición de la gluconeogénesis en el modelo *in vivo* ni en la actividad catalítica de la enzima G-6-Pasa en la parte *in vitro* de modo que el mecanismo de acción no está relacionado con inhibir a la gluconeogénesis, sin embargo, falta realizar estudios para descartar que su efecto hipoglucemiante este dado por alguna otra vía como aumentar la sensibilidad a la insulina, o secreción de la misma.

En el caso del extracto etanol-agua de *R. mangle* se observa una disminución en la producción de glucosa hepática por medio de gluconeogénesis en la prueba de tolerancia a piruvato, lo cual concuerda con lo observado en la prueba *in vitro*, ya que muestra ser un potente inhibidor del complejo G-6-Pasa.

Debido a que en las comunidades del país utilizan tanto medicina alópata como las preparaciones tradicionales, *R. mangle* puede ser un coadyuvante para el tratamiento de DM2, y que al utilizarse con otro fármaco como metformina podría ayudar a mantener los niveles de glucosa plasmática estables.

Debido al resultado positivo observado con *R. mangle* se propone realizar pruebas de farmacocinética, para así tener parámetros importantes como vida media para lograr un esquema de administraciones que ayude a que el efecto hipoglucemiante del extracto se observe por más tiempo.

En la parte de inhibición del complejo G-6-Pasa, se sugiere realizar ensayos para poder dilucidar si la inhibición es de tipo competitiva, no competitiva o acompetitiva, y así lograr esclarecer el mecanismo de acción de los metabolitos del extracto. Otro punto importante sería analizar si el extracto muestra efecto inhibitorio sobre las demás enzimas reguladoras de la vía metabólica.



Referencias

- Alarcon-Aguilara, F. ., Roman-Ramos, R., Perez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. ., & Flores-Saenz, J. . (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 101–110. [http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00020-8](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00020-8)
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 28(suppl_1), S37–S42. http://doi.org/10.2337/diacare.28.suppl_1.S37
- American Diabetes Association. (2016). Standards of Medical care in diabetes 2016. *Diabetes Care*, 39(Supplement 1), S1–S112. Retrieved from <http://care.diabetesjournals.org/site/misc/2016-Standards-of-Care.pdf?platform=hootsuite>
- Andrade-Cetto, A. (2015). Diabetes and Metabolic Disorders: An Ethnopharmacological Perspective. In M. Heinrich & A. Jäger (Eds.), *Ethnopharmacology* (Primera, pp. 227–237). United Kingdom: John Wiley & sons Ltd.
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–48. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2011). From the field into the lab: useful approaches to selecting species based on local knowledge. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 20. <http://doi.org/10.3389/fphar.2011.00020>
- Andrade-Cetto, A., & Medina-Hernández, A. E. (2013). Hypoglycemic effect of *Bromelia plumieri* (E. Morren) L.B. Sm., leaves in STZ-NA-induced diabetic rats. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 36. <http://doi.org/10.3389/fphar.2013.00036>
- Andrade-Cetto, A., & Rubalcaba-Mares, M. L. (2012). Hypoglycemic effect of the *Rhizophora Mangle* Cortex on STZ-NA- Induced Diabetic Rats. *PharmacologyOnLine*, 3, 1–5.



- Arion, W., Canfield, W., Ramos, F., Schindler, P., Burger, H.-J., Hemmerle, H., ... Herling, A. (1997). Chlorogenic Acid and Hydroxynitrobenzaldehyde: New Inhibitors of Hepatic Glucose 6-Phosphatase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(2), 315–322.
- Bano, G. (2013). Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 27(5), 715–26.
<http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.02.007>
- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Retrieved from <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Charkoudian, L. K., Farrell, B. P., & Khosla, C. (2012). Natural product inhibitors of glucose-6-phosphate translocase. *MedChemComm*, 3, 926.
<http://doi.org/10.1039/c2md20008b>
- CONABIO. (2015a). Aguama (*Bromelia karatas*). Retrieved March 4, 2016, from <http://www.enciclovida.mx/especies/6026279>
- CONABIO. (2015b). Mangle rojo (*Rhizophora mangle*). Retrieved March 1, 2016, from <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6030929>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., ... Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, (July), 15019. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2012). Diabetes mellitus: La urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Retrieved from <http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/DiabetesMellitus.pdf>
- Gilani, A. H., & Atta-ur-Rahman. (2005). Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 43–49.
<http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.001>
- Hanson, R. W., & Owen, O. E. (2013). *Gluconeogenesis*. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00040-2>



- Hardie, D. G. (2013). Metformin—Acting through Cyclic AMP as well as AMP? *Cell Metabolism*, 17(3), 313–314. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.011>
- 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. [http://doi.org/10.1016/S0277-9536\(98\)00181-6](http://doi.org/10.1016/S0277-9536(98)00181-6)
- Heinrich, M., & Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(4), 425–432. <http://doi.org/10.1211/0022357011775712>
- Heinrich, M., & Jäger, A. K. (Eds.). (2015). *Ethnopharmacology* (Primera). United Kingdom: John Wiley & sons Ltd.
- Hornung-Leoni, C. T. (2011). Avances sobre Usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 10(4), 297–314.
- International Diabetes Federation. (2015). *IDF diabetes atlas* (Seventh).
- Joshi, S. R., Parikh, R. M., & Das, A. K. (2007). Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 55 Suppl(JULY), 19–25.
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., ... Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47(2), 224–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9519717>
- Mata Torres Valle, G. (2014). *Estudio crónico del efecto hipoglucemiante de la corteza de Rhizophora mangle en ratas diabéticas STZ-NA*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Naturalista. (2016). Aguama (*Bromelia karatas*). Retrieved March 4, 2016, from <http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/277363-Bromelia-karatas>
- Olivares Reyes, J., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Postic, C., Dentin, R., & Girard, J. (2004). Role of the liver in the control of



- carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes & Metabolism*, 30(5), 398–408. [http://doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70133-7](http://doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70133-7)
- Rubalcaba, M. (2012). *Efecto hipoglucemiante de la corteza de Rhizophora mangle en ratas tratadas con NAD-STZ*. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799–806.
- Sánchez Villaseñor, G. (2016). *Estudio crónico del efecto hipoglucemiante de las hojas de Bromelia karatas L. en ratas STZ-NA*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sharabi, K., Tavares, C. D. J., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Molecular Aspects of Medicine*, 46, 21–33. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.003>
- Sośnicki, S., Kapral, M., & Węglarz, L. (2016). Molecular targets of metformin antitumor action. *Pharmacological Reports*. <http://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.04.021>
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J., & van Haften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365(9467), 1333–46. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61032-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61032-X)
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 237(5), 481–90. <http://doi.org/10.1258/ebm.2012.011372>
- Tan, G. D. (2014). The pancreas. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 15(10), 485–488. <http://doi.org/10.1016/j.mpaic.2014.07.010>
- Thomas, S. S., Zhang, L., & Mitch, W. E. (2015). Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic kidney disease. *Kidney International*, 88(6), 1233–1239. <http://doi.org/10.1038/ki.2015.305>
- Trinh, B. T. D., Staerk, D., & Jäger, A. K. (2016). Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. *Journal of*



Ethnopharmacology, 186, 189–195.

<http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.060>

- van Schaftingen, E., & Gerin, I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *The Biochemical Journal*, 362(Pt 3), 513–32. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1222414&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vlietinck, A., Pieters, L., & Apers, S. (2009). Legal Requirements for the Quality of Herbal Substances and Herbal Preparations for the Manufacturing of Herbal Medicinal Products in the European Union. *Planta Medica*, 75(7), 683–688. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1185307>
- Waller, D. P. (1993). Methods in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 38, 189–195.
- Zheng, S., & Mathews, C. E. (2014). Metabolic abnormalities in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 14(9), 519. <http://doi.org/10.1007/s11892-014-0519-8>