



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PARTE AÉREA DE
***Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. Y DEL L-**
QUIROINOSITOL SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN RATAS STZ-NA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANGELINA DANIELA MORENO VARGAS

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COTUTOR(A) DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. TATIANA FIORELISIO COLL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO ENERO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA PARTE AÉREA DE
***Ageratina petiolaris* (Moc. Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. Y DEL L-**
QUIROINOSITOL SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA EN RATAS STZ-NA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANGELINA DANIELA MORENO VARGAS

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COTUTOR(A) DE TESIS: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. TATIANA FIORELISIO COLL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO ENERO, 2019

OFICIO FCIE/DAIP/1186/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. 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 **12 de noviembre de 2018** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la alumna **MORENO VARGAS ANGELINA DANIELA** con número de cuenta **306097869** con la tesis titulada "**Estudio del efecto del extracto acuoso de la parte aérea de *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. y del L-quirositol sobre la secreción de insulina en ratas STZ-NA**", realizada bajo la dirección del **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: **DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ**
Vocal: **DRA. CELIA BUSTOS BRITO**
Secretario: **DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA**
Suplente: **DR. MYRIAN VELASCO TORRES**
Suplente: **DRA. SONIA MARLEN ESCANDÓN RIVERA**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 7 de diciembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf*

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la oportunidad que me brindó para continuar con mis estudios.

A CONACYT por la beca que me otorgó (CVU 629783) la cual me ayudó a realizar mis estudios de maestría.

Al Proyecto DGAPA PAPIIT clave del proyecto IN228216 por el financiamiento de la presente investigación.

A mi Tutor, él Dr. Adolfo Andrade Cetto por brindarme el espacio y los elementos necesarios para realizar mis experimentos y por sus consejos y su paciencia a lo largo del proyecto.

A los miembros de mi Comité tutor la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera y a la Dra. Tatiana Fiordelicio Coll por su asesoría, por el tiempo destinado para evaluar este proyecto y por la revisión y correcciones del presente trabajo.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto por todo el apoyo brindado y por la oportunidad de continuar mis estudios bajo su tutela.

A la Dra. Celia Bustos Brito por la donación del compuesto L-quirositol (*L-chiro*-inositol) utilizado en esta investigación y por la revisión de esta tesis.

A lo Dra. Sonia Escandón Rivera por ayudarme en las cuestiones de fitoquímica y por las observaciones realizadas en el escrito.

A la Dra. Myrian Velasco Torres y al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por la revisión y sus valiosas aportaciones al presente escrito.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio Gaby, Arte y Gerardo, gracias por estar en los momentos difíciles gracias por sus consejos y ánimos a lo largo de todo este tiempo.

A Chris por escucharme y por facilitarme a los seres fundamentales para la realización de mi trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio por hacer que el laboratorio sea un lugar ameno y agradable y hacerme sentir el lugar de trabajo como mi segundo hogar.

A mis padres por la confianza depositada en mí y a su apoyo incondicional, muchas gracias por su tiempo, paciencia y sobre todo el amor que me brindan.

Y finalmente a mi Dany por seguir siendo parte de mi vida y por permitirme ser parte de la tuya, gracias por escucharme y gracias por las palabras de aliento en mis momentos de mayor desesperación.

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	10
HIPÓTESIS	11
ANTECEDENTES	12
1. Homeostasis de la glucosa y secreción de insulina	12
2. Diabetes mellitus	20
2.1. Clasificación	20
2.1.1. Diabetes mellitus tipo 2	21
- Sintomatología	23
- Complicaciones	23
- Diagnóstico	25
- Tratamiento	26
Glibenclamida	28
3. Modelo STZ – NA (Masiello, 1998).	29
4. Plantas con efecto hipoglucemiante	30
4.1. <i>Ageratina petiolaris</i>	31
- Antecedentes fitoquímicos	33
- Antecedentes farmacológicos	34
- Antecedentes farmacológicos de los compuestos mayoritarios	34
METODOLOGÍA	35
1. Elaboración del extracto acuoso de <i>Ageratina petiolaris</i>	35
1.1. Obtención del L-quiuroinósitol (<i>L-chiro</i> -inositol) en el extracto acuoso	35
2. Evaluación del efecto de los tratamientos <i>in vivo</i>	35
2.1. Inducción de hiperglucemia (modelo STZ-NA)	35
2.1.1. Administración de tratamientos	35
- Cuantificación de glucosa	36
- Cuantificación de insulina	36
3. Análisis estadístico	37
- Glucosa	37
- Insulina	37
RESULTADOS	38
- Glucosa	38
- Insulina	40
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Islotes de Langerhans del páncreas endócrino.	12
Figura 2: Homeostasis de la glucosa.	13
Figura 3: Proceso de producción de insulina.	13
Figura 4: Secreción de insulina mediada por glucosa.	14
Figura 5: GRPCRs involucrados en la liberación de insulina de las células β pancreáticas.	15
Figura 6: Secreción bifásica de la insulina.	16
Figura 7: Receptor de insulina (IR).	17
Figura 8: Translocación del GLUT4.	18
Figura 9: Activación de la vía MAP cinasas por efecto de la insulina.	19
Figura 10: La disfunción del adipocito está vinculada con el desarrollo de resistencia a la insulina.	22
Figura 11: Efectos del aumento en la concentración de ácidos grasos libres en tejidos periféricos.	23
Figura 12. Complicaciones asociadas con la DM tipo 2.	24
Figura 13: Principales órganos blanco y acción de los hipoglucemiantes orales más utilizados en el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2.	26
Figura 14: Mecanismo de acción de la glibenclamida.	28
Figura 15: Estreptozotocina (STZ).	29
Figura 16: Nicotinamida (NA).	29
Figura 17: <i>Ageratina petiolaris</i> (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H.Rob.	32
Figura 18: Distribución geográfica de <i>Ageratina petiolaris</i> o <i>Eupatorium petiolare</i> .	32
Figura 19: Ácido clorogénico.	33
Figura 20: L-quiroinositol (<i>L-chiro</i> -inositol).	33
Figura 21: Valores de glucosa plasmática (mg/dL) de los grupos experimentales.	38
Figura 22: Valores de insulina plasmática (ng/mL) de los grupos experimentales.	40
Figura 23: Normalización de los valores de insulina de los grupos experimentales.	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales hipoglucemiantes orales utilizados en el tratamiento de la DM2.	27
Tabla 2: Grupos experimentales con su respectivo tratamiento (n=6).	36
Tabla 3: Valores de glucosa plasmática (mg/dL) de los grupos experimentales.	38
Tabla 4: Valores de insulina plasmática (ng/mL) de los grupos experimentales.	40
Tabla 5: Normalización de los valores de insulina de los grupos experimentales.	42



ABREVIATURAS

Ach	: Acetilcolina
AC	: Adenilato ciclasa
ADA	: Asociación Americana de Diabetes
ADP	: Adenosin difosfato
AKT	: Proteína cinasa B
ASP	: Proteína adaptadora con dominios de pleckstrina y SH2.
ATP	: Adenosin trifostato
Ca ²⁺	: Calcio
cAMP	: Adenosin monofosfato cíclico
CAP	: Proteína asociada con Cbl
CCK	: Colecistoquinina
CGRP	: Gen relacionado con el de la calcitonina
Cib	: Proteína que une ubiquitina
Crk	: Reguladores cinasa de virus tumoral de pollo
DAG	: Diacilglicerol
DM	: Diabetes mellitus
ENSANUT MC	: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino
Epac	: Proteína intercambiadora activada por cAMP
GRb2	: Proteína adaptadora que une al factor de crecimiento 2
H	: Hiperglucémico
HbA1C	: Hemoglobina glicada
HDL	: Lipoproteína de alta densidad
HE	: Hiperglucémico + Extracto acuoso de <i>Ageratina petiolaris</i>
HG	: Hiperglucémico + Glibenclamida
HL	: Hiperglucémico + L-quirositol
IDF	: Federación Internacional de Diabetes
IL-6	: Interleucina 6
IP3	: Inositol 1,4,5-trifosfato
IR	: Receptor de insulina
IRS	: Sustrato del receptor de insulina
GIP	: Polipéptido inhibidor gástrico



GLP-1	: Glucagón tipo 1
GLUT	: Transportador de glucosa
GPCR's	: Receptores acoplados a proteínas G
K ⁺	: Potasio
MAP	: Vía activada por mitógenos
M3R	: Receptor muscarínico
MODY	: Diabetes de la edad madura que se presenta en el joven
N	: Normoglucémico
Na ⁺	: Sodio
NA	: Nicotinamida
NAD ⁺	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NPY	: Neuropeptido Y
PACAP	: Polipeptido de la adenilato ciclasa
PARP-1	: Poli (ADP - ribosa) polimerasa 1
PI3K	: Vía del fosfatidilinositol 3 - cinasa
PDK	: Cinasa dependiente de fosfoinositidos
PKA	: Proteína cinasa A
PKC	: Proteína cinasa C
RE	: Retículo endoplásmico
Ser	: Serina
SIDA	: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
STZ	: Estreptozotocina
Thr	: Treonina
Tnf- α	: Factor de necrosis tumoral α
Tyr	: Tirosina
TZD	: Tiazolidinedionas
VIH	: Virus de inmunodeficiencia humano
VIP	: Polipéptido vasoactivo intestinal
VDCC	: Canal de Ca ²⁺ dependiente de voltaje



RESUMEN

La Diabetes mellitus (DM), principalmente la DM tipo 2 es una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial. Los pacientes con dicha enfermedad presentan hiperglucemia crónica debido a la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos blanco de esta hormona. El tratamiento para la DM tipo 2 consiste en una dieta balanceada acompañada de ejercicio y la ingesta de fármacos para controlar los niveles de glucosa sanguínea. En el presente trabajo se utilizó como control positivo de los tratamientos el fármaco glibenclamida que pertenece a las sulfonilureas caracterizadas por ser secretagogos de insulina.

En México hay aproximadamente 12 millones de personas diabéticas y es uno de los países en los que se utilizan plantas medicinales como remedio alternativo para tratar dicha enfermedad, una de ellas es *Ageratina petiolaris*. El extracto acuoso de esta planta mostró tener efecto hipoglucemiante y estudios fitoquímicos revelaron que tiene dos compuestos mayoritarios a los cuales se les adjudica este efecto; el ácido clorogénico que es un compuesto que inhibe la gluconeogénesis y el L-quirositol (*L-chiro*-inositol) que podría contribuir a la secreción de insulina.

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto sobre la secreción de insulina tanto del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* como el del compuesto L-quirositol aislado de este mismo sobre la secreción de insulina en ratas STZ-NA.

Se corroboró el efecto hipoglucemiante del extracto acuoso, aunque no aumentó la secreción de insulina de manera estadísticamente significativa.

Por otro lado, el compuesto L-quirositol mostró un efecto hipoglucemiante tardío al ser comparado con el grupo control hiperglucémico y aumento la secreción de insulina hasta de un 200%.

En conclusión, el efecto hipoglucemiante de *Ageratina petiolaris* se debe al efecto sinérgico de los compuestos presentes en el extracto acuoso y no solo a uno de los compuestos mayoritarios.



ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM), mainly DM type 2, is a highly prevalent disease worldwide. Patients with this disease have chronic hyperglycemia due to the insulin resistance of peripheral target tissues to this hormone.

The treatment for DM type 2 consists of a balanced diet, exercise and the intake of drugs to control blood glucose levels. In the present work, the drug glibenclamide, which belongs to the sulphonylureas characterized by being insulin secretagogues, was used as positive control.

In Mexico, there are approximately 12 million diabetic people and it is one of the countries where medicinal plants are used, as an alternative remedy to treat this disease, one of them is *Ageratina petiolaris*. The aqueous extract of this plant showed hypoglycemic effect, phytochemical studies revealed it has two major compounds to which its effect is attributed: chlorogenic acid, a compound that inhibits gluconeogenesis and *L-chiro*-inositol that could contribute to insulin secretion.

In the present research work, the effect on insulin secretion of both; the aqueous extract and *L-chiro*-inositol were evaluated. The hypoglycemic effect of the extract was corroborated, although insulin secretion did not increase in a statistically significant way. On the other hand, the *L-chiro*-inositol showed a late hypoglycemic effect, when compared to the Hyperglycemic control group and increased insulin secretion up to 200%.

In conclusion, the hypoglycemic effect of *Ageratina petiolaris* is due to the synergistic effect of the compounds present in the aqueous extract and not only to one of the major compounds.



INTRODUCCION

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas donde los pacientes se caracterizan por presentar hiperglucemia resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica característica de la diabetes está asociada con daños a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, corazón, nervios y vasos sanguíneos.

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA) la DM se puede clasificar en cuatro tipos la DM tipo 1, la DM gestacional, tipos específicos de DM y la DM tipo 2 que representa alrededor del 90 al 95% de los casos de diabetes y está relacionada con el sobrepeso y obesidad (ADA, 2018).

La Federación Internacional de Diabetes (IDF) calculó que en el año 2017 había 425 millones de personas diabéticas en todo el mundo y estima que para el año 2045 el número de personas con esta enfermedad aumentará a 629 millones (IDF, 2017).

Cifras de la misma federación indican que en México, en el año 2017, había 12 millones de personas diabéticas y el gasto público para tratar esta enfermedad fue de 19 millones de dólares. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino del año 2016 (ENSANUT MC) muestra que la prevalencia de diabetes en nuestro país ha ido en aumento por ejemplo en el año 2006 la prevalencia era de 7.2%, para el año 2012 aumentó a 9.2% y para el año 2016 se calculó una prevalencia del 9.4% afectando principalmente a mujeres (ENSANUT MC,2016) (IDF, 2017).

Debido al incremento de la prevalencia de la DM tipo 2 en nuestro país y que gran parte de los pacientes utilizan un tratamiento alternativo para ayudar a controlar la enfermedad, en el presente trabajo se evaluó el efecto del extracto acuoso de la parte aérea de *Ageratina petiolaris* y uno de sus compuestos mayoritarios el L-quirositol sobre los niveles de insulina secretados en ratas con hiperglucemia inducida por el modelo estreptozotocina-nicotinamida (STZ-NA). Dicha planta es utilizada en algunas comunidades del Estado de México para tratar la DM. En estudios realizados por Bustos-Brito y colaboradores en el año 2016 dicha planta mostró tener efecto hipoglucemiante aislaron e identificaron sus compuestos mayoritarios: el ácido clorogénico y el L-quirositol (*L-chiro*-inositol). También el extracto de esta planta mostró un efecto inhibitorio de la gluconeogénesis, este efecto puede estar dado por la presencia del ácido clorogénico, ya que, se ha comprobado que este compuesto inhibe el transportador de glucosa-6- fosfato del complejo enzimático glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) una enzima importante para la gluconeogénesis (Espinoza-Hernández, 2017).

Debido a los antecedentes fitoquímicos y farmacológicos mostrados por la especie *A. petiolaris*, se requiere de más estudios para dilucidar los mecanismos de acción por los cuales esta planta presenta efecto hipoglucemiante, uno de ellos el posible aumento en la secreción de insulina.



OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de *Ageratina petiolaris* sobre los niveles de insulina plasmática.

Particulares

- ✓ Analizar el efecto de la administración del extracto acuoso de la parte aérea de *Ageratina petiolaris* con una dosis de 160 mg/kg sobre los niveles de insulina plasmática en ratas STZ-NA.
- ✓ Analizar el efecto de la administración del compuesto L-quirositol con una dosis de 3.73 mg/kg aislado de *Ageratina petiolaris* sobre los niveles de glucosa e insulina plasmática en ratas STZ-NA.



HIPÓTESIS

- ❖ La administración del extracto acuoso de la parte aérea de *Ageratina petiolaris* aumentará la concentración de insulina plasmática en ratas STZ-NA.
- ❖ La administración del compuesto L-quiuroinósitol aislado de *Ageratina petiolaris* tendrá un efecto hipoglucemiante y aumentará la concentración de insulina plasmática en ratas STZ-NA.

ANTECEDENTES

1. Homeostasis de la glucosa y secreción de insulina

La concentración plasmática de glucosa se mantiene en niveles de alrededor de 90 mg/dl mediante el equilibrio entre la absorción intestinal de glucosa, la glucogenólisis hepática y la gluconeogénesis tanto en el hígado como en riñón (Segura & Ruilope, 2013).

Existen dos hormonas principales que mantienen las concentraciones de glucosa en niveles adecuados, el glucagón y la insulina, ambas hormonas son secretadas por células pancreáticas. El páncreas endocrino tiene un papel esencial en la regulación del metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos. La unidad histológica del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, estos islotes están compuestos de cuatro tipos celulares: las células α productoras de glucagón, células β productoras de insulina y amilina, células δ productoras de somatostatina y células PP productoras del polipéptido pancreático (Figura 1) (Tébar & Escobar, 2009).

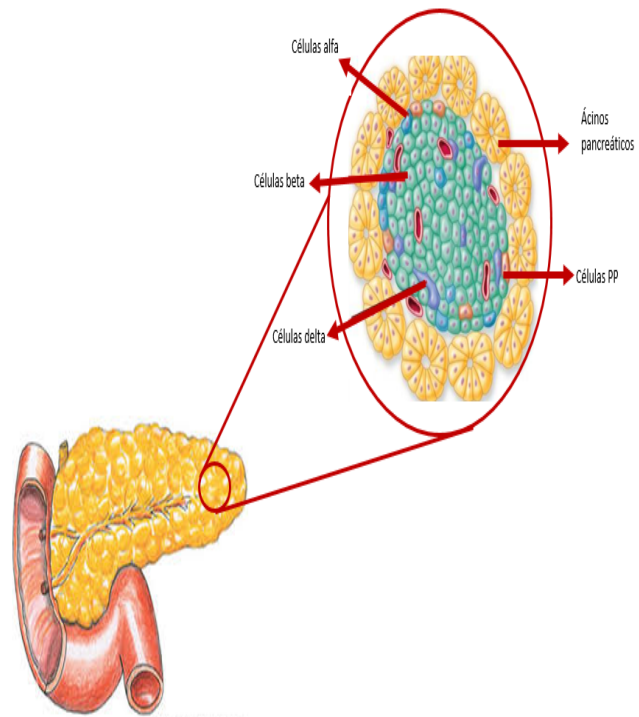


Figura 1: Islotes de Langerhans del páncreas endocrino

Cuando los niveles de glucosa se encuentran en concentraciones bajas, las células α pancreáticas son estimuladas secretando glucagón, esta hormona ejerce su efecto en el hígado, en el cual estimula la glucogenólisis y la gluconeogénesis aumentando la concentración plasmática de glucosa (Tébar & Escobar, 2009).

Por otro lado, cuando los niveles de glucosa se encuentran elevados, por ejemplo, después de la ingesta de alimentos, la hormona que actúa es la insulina la cual es secretada por las células β pancreáticas, la secreción de esta hormona es bifásica si el estímulo (concentraciones elevadas de glucosa) se mantiene constante (Figura 2).

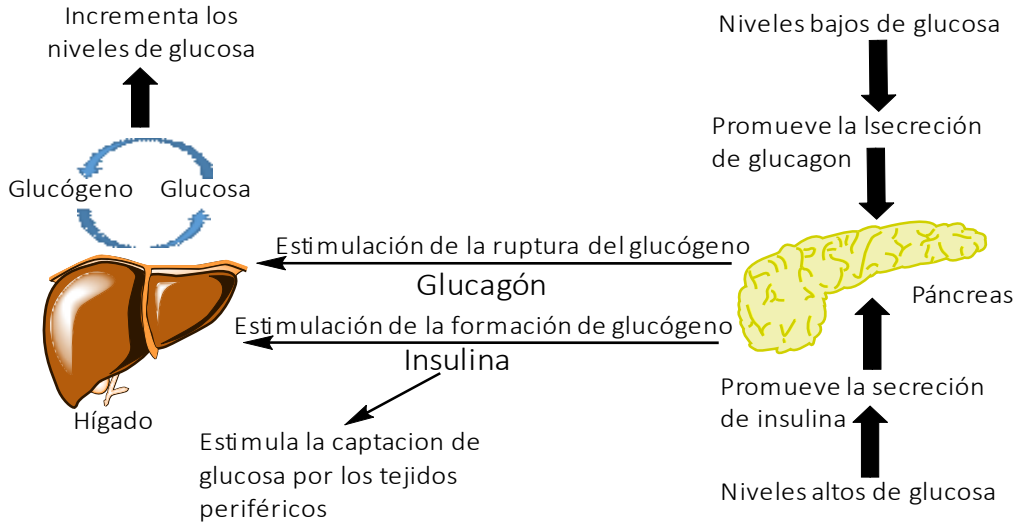


Figura 2: Homeostasis de la glucosa. Cuando los niveles de glucosa incrementan, las células β secretan insulina, dicha hormona estimula a sus tejidos blanco a captar esta glucosa, a su vez esta glucosa es convertida en glucógeno y triglicéridos. Por otro lado, cuando los niveles de glucosa disminuyen, las células α secretan glucagón lo cual estimula la liberación de glucosa desde el hígado.

Tomada y modificada de Kaul, K. et al. , (2012). Capítulo 1: Introduction of Diabetes mellitus. En S. I. Ahmad (Ed.). Diabetes: An Old disease, a New Insight.

La insulina es una hormona peptídica de 5.8 KDa que está conformada por dos cadenas peptídicas unidas por dos puentes de disulfuro.

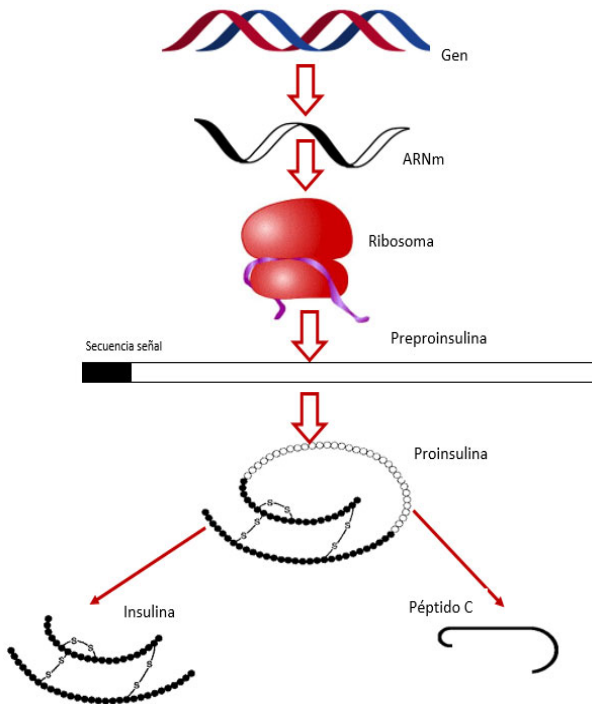


Figura 3: Proceso de síntesis de insulina

Tomada y modificada de Tébar & Escobar, (2009). Diabetes en la práctica clínica.

La transcripción de dicha hormona está regulada por nutrientes, principalmente por las concentraciones de glucosa, por citosinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α y por ella misma generando una cascada de señalización de retroalimentación positiva. El proceso síntesis de insulina comienza cuando el RNAm se traduce a preproinsulina en el ribosoma, la preproinsulina es trasladada al aparato de Golgi donde le es desprendido el péptido N-terminal generando proinsulina, la cual, es empaquetada en gránulos, dentro de los cuales, la proinsulina es transformada en insulina y péptido C; estos gránulos ya están listos para ser liberados en caso de un estímulo de secreción de insulina (Figura 3) (Tébar & Escobar, 2009).

Como se mencionó anteriormente el principal inductor de la secreción de insulina es la glucosa. El proceso inicia con la entrada de glucosa por transportadores de glucosa conocidos como GLUT, en el caso de los humanos es GLUT1 y de los roedores es GLUT2, ubicados en la membrana plasmática de la célula β pancreática.

Una vez en el interior, la glucosa es metabolizada aumentando los niveles de ATP/ADP, debido a este incremento se cierran los canales de potasio sensibles a ATP, estos canales actúan como un sensor metabólico, ya que el cierre de estos responden a la concentración de los nucleótidos ATP/ADP, dicho cierre inicial provoca una baja despolarización del potencial de membrana, que, cuando alcanza los -40mV provoca la apertura de los canales de Na^+ y los canales de Ca^{2+} tipo T dependientes de voltaje, tanto el incremento de Na^+ como el de Ca^{2+} intracelular causan una mayor despolarización de la membrana.

Cuando el potencial de membrana alcanza los -20mV se abren los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje, lo cual aumenta aún más los niveles de Ca^{2+} intracelular provocando la secreción de los gránulos preformados de insulina (Figura 4) (Hiriart & Aguilar 2008).

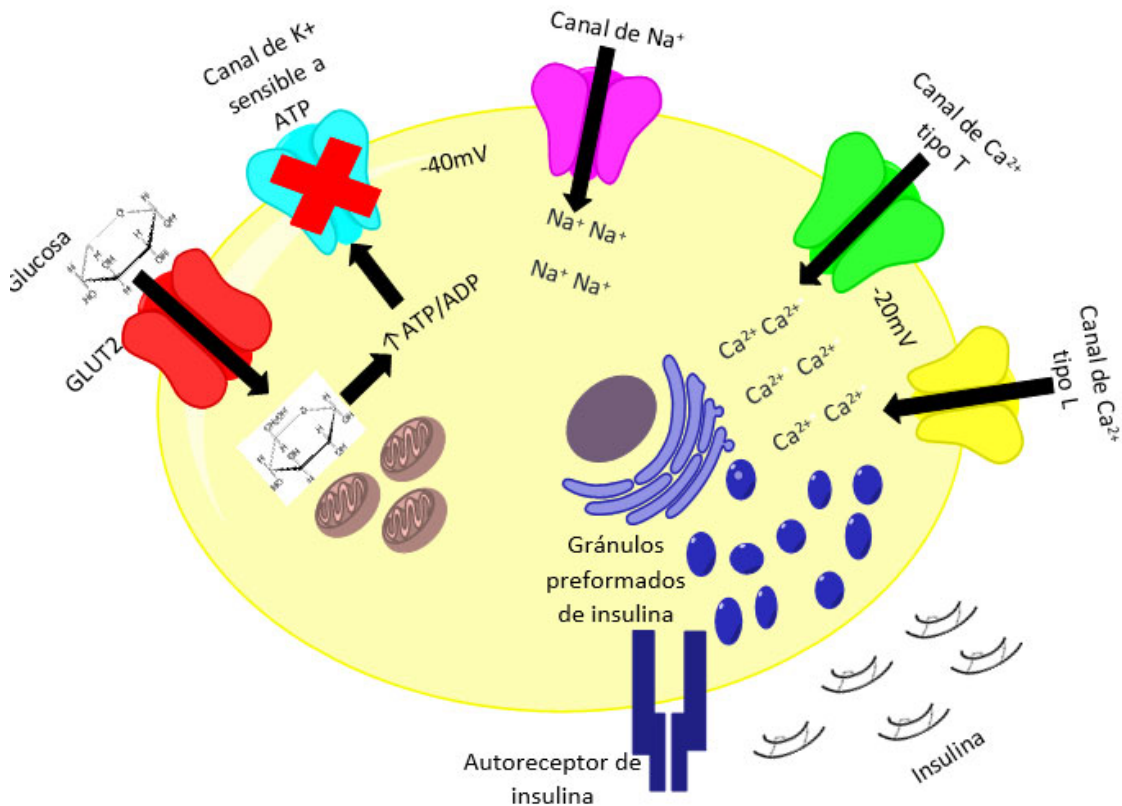


Figura 4: Secreción de insulina mediada por glucosa. La glucosa entra a través de GLUT2 a la célula β pancreática, ya en el interior la glucosa es metabolizada, lo que aumenta la concentración de ATP/ADP, dicho aumento provoca el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP lo que a su vez provoca la apertura tanto de los canales de Na^+ como los de Ca^{2+} tipo T, una vez abiertos, estos canales causan una mayor despolarización de la membrana y dicha despolarización causa la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L, con esta acción la concentración intracelular de Ca^{2+} es suficiente para llevar a cabo la exocitosis de los gránulos preformados de insulina.

Modificada de Hiriart, Marcia y Lydia Aguilar-Bryan (2008). Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic β -cell.

La secreción de insulina estimulada por glucosa es modulada por varios neurotransmisores y hormonas que se unen a receptores específicos ubicados en las membranas de las células beta pancreáticas. La gran mayoría de estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Las proteínas G, principalmente Gq11 y Gs, están vinculadas a vías de señalización específicas, las cuales, tienen múltiples efectos sobre la función de las células beta pancreáticas induciendo la regulación de la liberación de insulina; por otro lado, los receptores acoplados a Gi ejercen un efecto inhibitorio en la secreción de la insulina (Figura 5) (Ruiz de Azua et al., 2011).

Por ejemplo, el receptor del glucagón tipo 1 (GLP-1) está vinculado a Gs y está ampliamente expresado en las células beta pancreáticas, estos receptores en la actualidad son un blanco farmacológico que facilita la secreción de insulina y mejora la homeostasis de la glucosa (Figura 5) (Ruiz de Azua et al., 2011).

Las células beta pancreáticas también expresan receptores acoplados a Gq11, por ejemplo, el receptor muscarínico de acetilcolina M3R (ACh). La acetilcolina es el mayor neurotransmisor de los nervios periféricos parasimpáticos, ejerce una pronunciada estimulación de liberación de insulina sobre el páncreas; este efecto es de particular importancia durante la fase preabsortiva de la alimentación (Figura 5) (Ruiz de Azua et al., 2011).

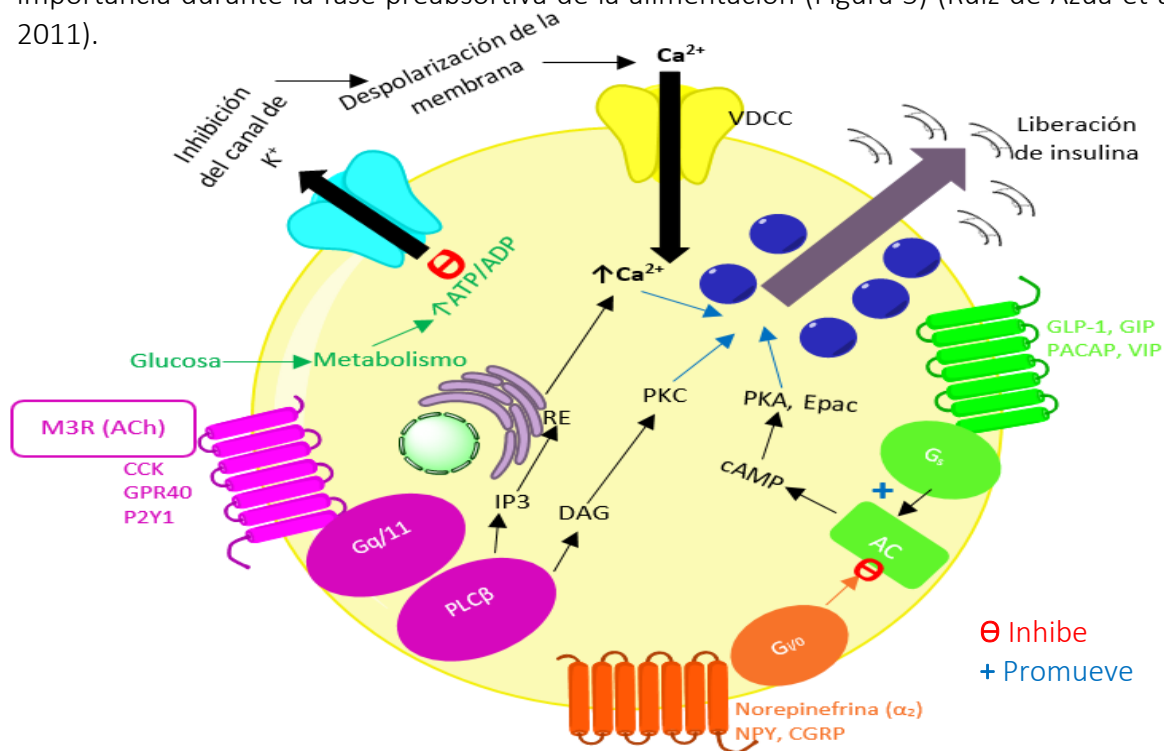


Figura 5: GRPCRs involucrados en la liberación de insulina de las células β pancreáticas. AC: adenilato ciclasa; ACh: acetil colina; GLP1: péptido similar al glucagón tipo 1; CCK: colecistoquinina; NPY: neuropéptido Y; CGRP: gen relacionado con el gen de la calcitonina; GIP: péptido insulínotropo dependiente de glucosa o polipéptido inhibitorio gástrico; M3R: receptor muscarínico; PACAP: polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria; VIP: polipéptido vasoactivo intestinal; VDCC: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje; DAG: diacilglicerol; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; PKA: proteína cinasa A; PKC: proteína cinasa C; RE: retículo endoplásmico; Epac: proteína intercambiadora activada por cAMP.

Modificada de Ruiz de Azua et al., (2011). Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implication.

Una vez dado el estímulo para la secreción de insulina ya sea mediante el paso de glucosa por GLUT2 o por acción de los GPCRs la secreción de insulina se da en dos fases. En la primera fase de secreción de insulina son liberados los gránulos preformados de insulina próximos a la membrana, esta respuesta es rápida comienza segundos después del estímulo y dura de cinco a diez minutos, esta fase es principalmente sensible a glucosa. La segunda fase de secreción de insulina es más prolongada que la primera, puede extenderse hasta por 120 minutos y se da la migración y liberación de los gránulos centrales de insulina y también hay síntesis de novo de esta hormona. A este tipo de respuesta se le conoce como secreción bifásica de insulina (Figura 6) (Hiriart & Aguilar, 2008) (Tébar & Escobar, 2009).



Figura 6: Secreción bifásica de la insulina. La secreción de insulina bifásica está dada en respuesta a la concentración extracelular de glucosa. Cuando la glucosa extracelular aumenta de una concentración basal a una concentración de glucosa estimulada de alrededor de 10 mM es observada la primera fase de secreción de insulina que se da en los primeros minutos; esta primera fase puede ser explicada por el cierre de los canales K_{ATP} y la activación de los canales K_{ATP} dependientes de voltaje o alimentando la vía de despolarización, lo cual, permite la exocitosis de pequeños gránulos de insulina. Cuando los niveles de concentración de glucosa se mantienen altos se observa la segunda fase de secreción de insulina. Cuando los niveles de glucosa se encuentran alrededor de los 5 a 6 mM se da un estado basal (secreción pulsátil de secreción de insulina) donde dicha secreción es constante y en menor grado y sirve para mantener la homeostasis de glucosa. (Hiriart & Aguilar, 2008) (Tébar & Escobar, 2009).

Una vez liberada la insulina, esta hormona ejerce su acción en tejidos blanco. La acción de la insulina esta mediada por cascadas de señalización que inician con la fosforilación de los residuos de tirosina (Tyr) del receptor de insulina. El receptor de insulina (IR) es una proteína compuesta por dos subunidades α (región extramembranal) y dos subunidades β (región extramembranal, transmembranal e intracelular) unidas por puentes de disulfuro (Figura 7) (Olivares et al., 2008).

Este receptor pertenece al grupo de receptores para factores de crecimiento que tienen actividad intrínseca de cinasas de Tyr, que al ser estimulados por la unión de la insulina en las subunidades α , estas presentan un cambio conformacional, dicho cambio permite que las subunidades β se autofosforilen quedando activado el receptor (Olivares et al., 2008)

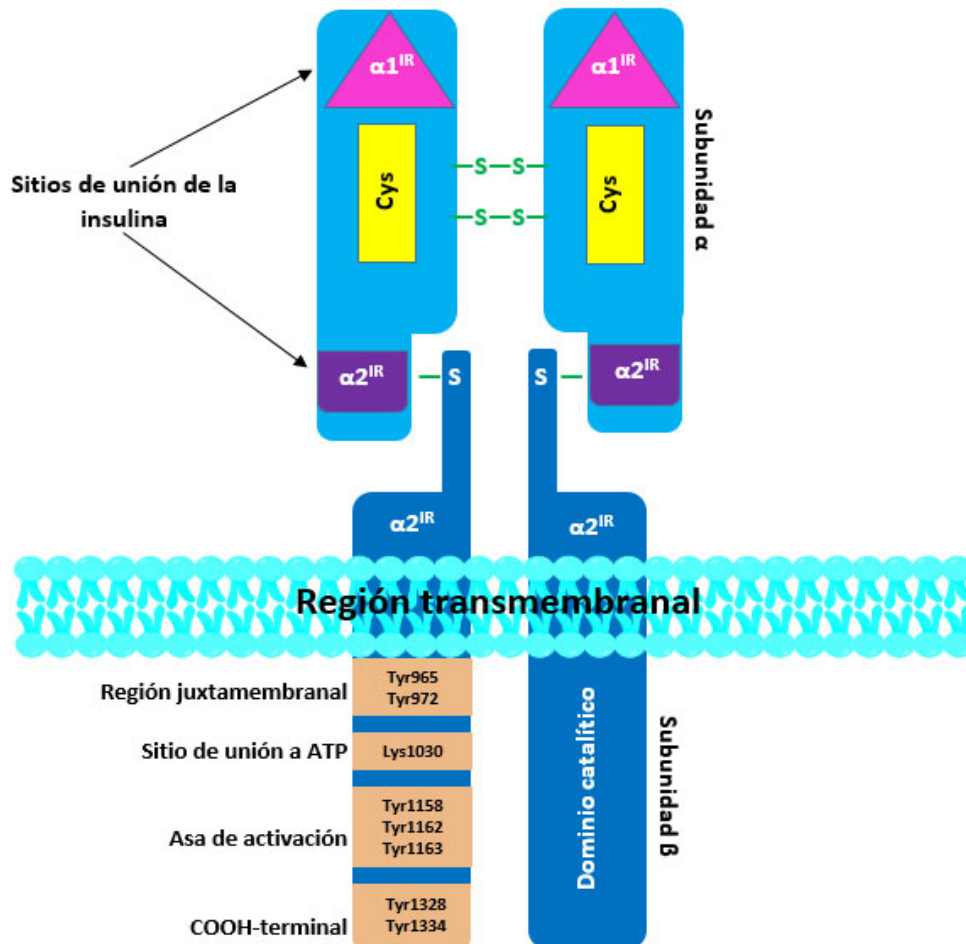


Figura 7: Receptor de insulina (IR). El IR es un heterotetramero constituido por dos subunidades α extracelulares las cuales contienen los sitios de unión de la insulina ($\alpha 1^{IR}$ y $\alpha 2^{IR}$) y dos subunidades ubicadas en el interior de las células con una región transmembranal en las cuales se localizan los sitios de fosforilación de tirosinas (Tyr) para que el IR se active después de la unión de la insulina.

Modificada de Olivares et al., (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina

Una vez activo el IR, se activan dos vías principales de transducción de señales, 1: la vía del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K/AKT) y 2: la vía activada por mitógenos (MAP cinasas).

1: Vía PI3K: vía por la cual la insulina mantiene la homeostasis de la glucosa al translocar GLUT4. Esta vía se activa una vez que el IR se autofosforila por la unión de la insulina; la activación del IR provoca la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS).

Existen cuatro isoformas del IRS, la isoforma involucrada en el transporte de glucosa es la isoforma 1 (IRS-1). Una vez fosforilados los IRS por el IR estos se convierten en sitios de unión y activación de proteínas con dominios SH2, como lo es PI3K, este último está conformado de una subunidad reguladora (p85 con dominios SH2 que permite la unión a los IRS) y de una subunidad catalítica (p110 cercana a la membrana plasmática).

La interacción de p85 y del IRS-1 activa a p110 y por su cercanía a la membrana tiene acceso al fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) y al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI4,5-P2), estos sustratos son fosforilados en la posición 3 del inositol formando PI3,4-bisfosfato y PI3,4,5-trifosfato (PIP2 y PIP3 respectivamente). PIP3 tiene un sitio de unión en PDK1 (cinasa dependiente de fosfoinositidos) que es una cinasa de serina también se activa PDK2, una vez fosforiladas estas dos proteínas se activa Akt. La activación de Akt tiene efectos en diferentes vías y el resultado de esto es que promueve la síntesis de glucógeno, inhibe la lipólisis y aumenta la lipogénesis (Khan & Pessin, 2002) (Olivares et al., 2008).

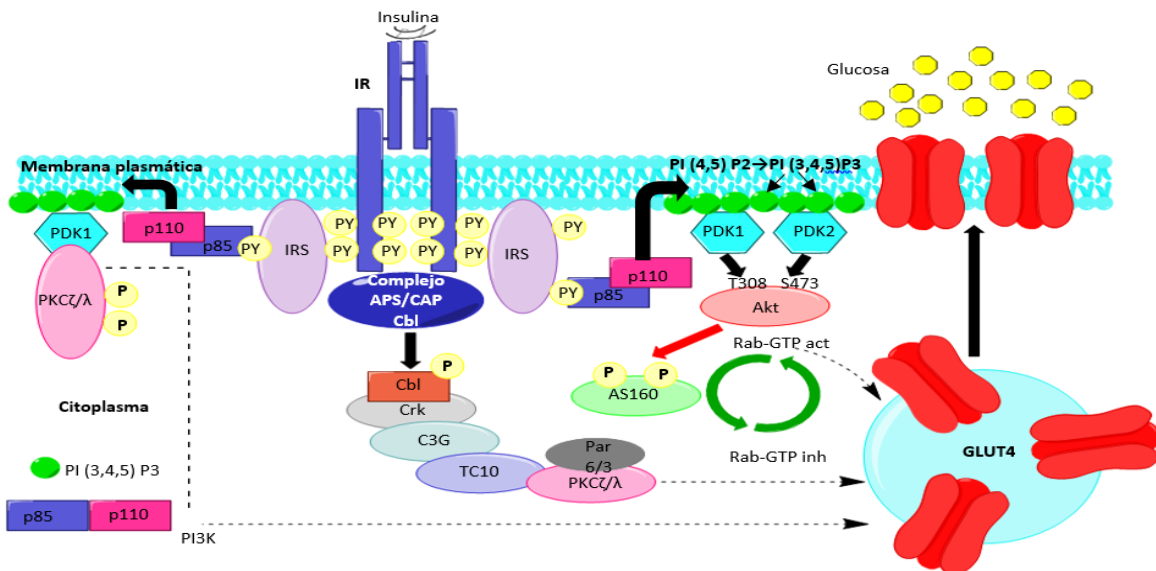


Figura 8: Translocación del GLUT4. El tráfico de GLUT4 depende de varios mecanismos, uno de ellos es el de la AS160. AS160 tiene dominios Rab/GAP y es sustrato de Akt, en su estado no fosforilado y activo inhibe la actividad de las proteínas G pequeñas Rab (Rab-GTP inh) estas proteínas participan en el tráfico de las vesículas que contienen GLUT4. Cuando AS160 es fosforilada por Akt esta proteína se inhibe y se libera la vía de las proteínas G pequeñas Rab (Rab-GTP act) y como resultado se incrementa la translocación de GLUT4.

Otro mecanismo por el cual se transloca GLUT4, y que ha sido descrito en los adipocitos, es la vía que involucra la proteína Cbl y las proteínas adaptadoras APS y CAP, las cuales forman el complejo proteico APS/CAP/Cbl. Cuando el receptor de insulina (IR) se activa permite la fosforilación de Cbl, una vez sucedida dicha fosforilación, el complejo CAP/Cbl se separa del IR, esto permite que Cbl reclute a las proteínas Crk y C3G, esta última activa a la proteína TC10 la cual es una proteína G pequeña que favorece el tráfico vesicular de GLUT4. Por otro lado, también se activan las proteínas PKCζ/λ lo cual favorece aún más la translocación de GLUT4.

Tomada y modificada de Olivares et al., (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina.

2: Vía de las MAP cinasas o MEK: es la vía por la cual la insulina regula la síntesis de proteínas. La vía de las MAP cinasas participa principalmente en la regulación genética en los tejidos sensibles a la insulina, pero no participa en el transporte de glucosa. Existen dos principales mecanismos por los cuales se ve activada. El primero es cuando el IR se activa promoviendo la asociación de la proteína Shc. El segundo mecanismo por el cual se activa la vía de las MAP cinasas es dependiente de IRS, el cual depende de la autofosforilación del IR, una vez fosforilado el IR se activan los IRS (Olivares et al., 2008).

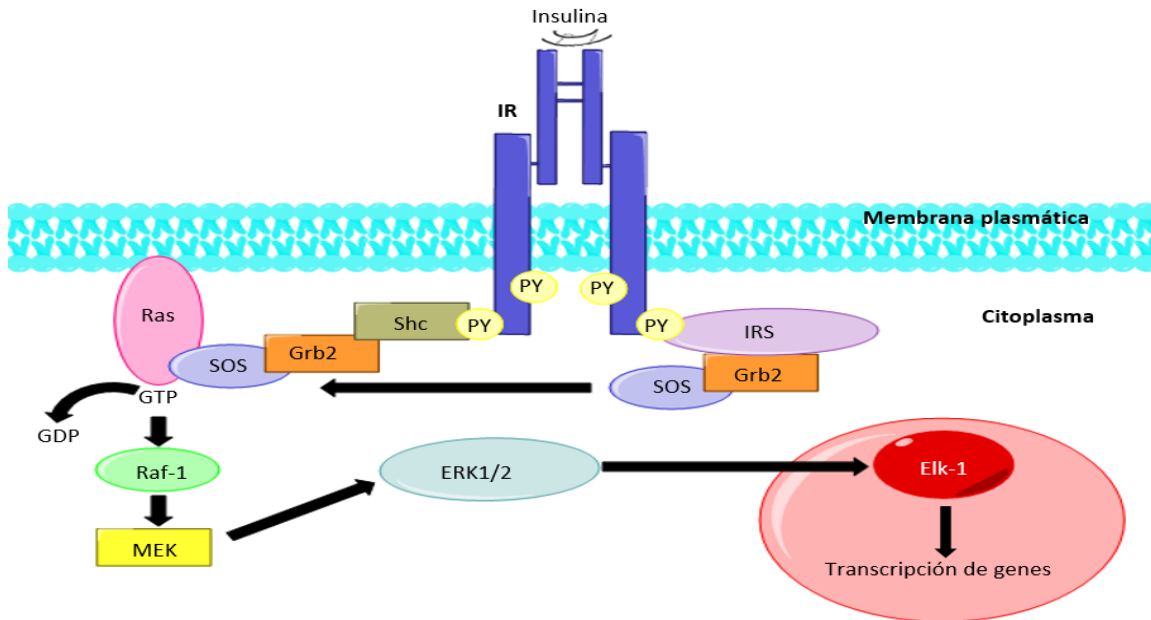


Figura 9: Activación de la vía MAP cinasas por efecto de la insulina. La autofosforilación del Receptor de insulina (IR) causa la unión de la proteína Shc que a su vez promueve la unión del complejo Grb2/SOS, SOS es una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina y esto causa la activación de Ras, GTP-Ras se une a Raf-1 que a su vez activa la vía que involucra a MEK o MAP cinasa y se activan tanto ERK1 como ERK2 (cinasa regulada extracelularmente 1 y 2). La autofosforilación del IR fosforila al IRS y una vez fosforilado este sustrato se une el complejo Grb2/SOS y se llevan a cabo los mismos pasos que se describieron anteriormente a partir del reclutamiento del complejo Grb2/SOS, esta es una vía que no depende de la unión de Shc. Tomada y modificada de Olivares et al., (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina.

Una vez que la insulina ha llevado a cabo su acción, las señales inducidas por la unión de la insulina con su receptor se ven reguladas a través de tres principales mecanismos. Dicha regulación es necesaria para el adecuado funcionamiento metabólico. Los mecanismos de regulación de la señal de la insulina son los siguientes:

1. Regulación del IR: se lleva a cabo mediante la endocitosis del receptor de insulina. En los endosomas primarios se realiza la degradación de la insulina y el IR es reciclado trastocándolo de nuevo a la membrana plasmática.
2. Regulación de los IRS: cuando se activa el IR, los IRS son fosforilados en los residuos de Tyr, cuando el IRS se fosforila en los residuos de Ser/Thr (Serina /Treonina) se ve disminuida la señal y los IRS se desacoplan de las proteínas de la vía de la insulina.
3. Regulación por debajo del IRS: involucra fosfatasas que inducen la desfosforilación del PIP3 truncando la vía de PI3K (Olivares et al., 2008).



2. Diabetes mellitus

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por presentar hiperglucemia resultado por defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con daños a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente los ojos, riñones, corazón y nervios. (ADA, 2018).

La IDF en el 2017 calculó que había 327 millones de personas de 20 a 64 años con diabetes mellitus y estima que para el año 2045 habrá 693 millones de personas de la misma edad con esta enfermedad

2.1. Clasificación

De acuerdo con la ADA (2018), existen cuatro principales tipos de diabetes las cuales se describen a continuación:

Diabetes mellitus tipo 1: representa entre un 5 al 10% de los casos de diabetes, también se le conoce como diabetes insulino-dependiente o diabetes juvenil. Es el resultado principalmente de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, aunque en algunos casos se desconoce su etología. Muchos pacientes principalmente niños y adolescentes presentan cetoacidosis como primera manifestación de la enfermedad.

Diabetes mellitus tipo 2: representa entre un 90 a 95 % de los casos de diabetes se caracteriza por la alteración en la secreción de insulina, resistencia en tejidos periféricos a la misma y aumento en la producción hepática de glucosa. Muchos de los pacientes presentan sobrepeso u obesidad por lo cual esta condición se asocia con la diabetes.

Diabetes gestacional: se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que comienza durante el embarazo independientemente de que si la insulina o la modificación de la dieta es usada para el tratamiento o si esta condición persiste después del embarazo.

Tipos específicos de diabetes debido a otras causas: entre los cuales se engloba a la diabetes monogénica que es causada por la disfunción de las células β pancreáticas, como la diabetes neonatal y MODY, menos del 5% de los pacientes diabéticos padecen este tipo de diabetes. Otro tipo es causado por enfermedades del páncreas exocrino como fibrosis quística y pancreatitis. El uso de glucocorticoides utilizados en el tratamiento de VIH/SIDA o después de un trasplante de algún órgano puede inducir químicamente diabetes.



2.1.1. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes, representa alrededor del 90% del total de los casos de diabetes. En este tipo de diabetes la hiperglucemia es el resultado de una producción inadecuada de insulina y de la incapacidad del cuerpo de responder a esta hormona a lo que se le conoce como resistencia a la insulina, que es su principal característica (IDF, 2017).

Este tipo de diabetes no es diagnosticada en etapas tempranas, debido a la existencia de hiperinsulinemia al inicio de la enfermedad, este estado de hiperinsulinemia compensa los niveles altos de glucosa, pero la hiperglucemia característica de la diabetes se va desarrollando gradualmente en conjunto con la disminución de la secreción de insulina causada por agotamiento de las células beta pancreáticas.

La hiperglucemia característica de la enfermedad es precedida por un estado de prediabetes, esta condición predispone a las personas a desarrollar DM2. La prediabetes tiene como características la alteración de los niveles de glucosa en ayuno (niveles de glucosa en ayuno más alto que los normales pero no entran en los criterios para ser diagnosticada como DM2, los individuos manifiestan resistencia a la insulina por parte del hígado y muestran alteración de la primera fase de la secreción de insulina), la alteración en la tolerancia a la glucosa (resistencia a la insulina por parte del músculo con alteración en la segunda fase de la secreción de insulina después de la ingesta de alimentos) o incremento en los niveles de hemoglobina glicada (De Fronzo et al., 2015).

La DM tipo 2 es diagnosticada principalmente en adultos, pero debido al aumento de la presencia de obesidad en niños y adolescentes, este tipo de diabetes aparece con más frecuencia en esta población (IDF, 2017).

Como se mencionó anteriormente la resistencia a la insulina es la principal característica de esta enfermedad, a continuación, se describe con más detalle esta condición.

La resistencia a la insulina es el principal factor de riesgo para desarrollar DM tipo 2, que es causada por la inhabilidad de los tejidos blanco de la insulina para responder apropiadamente a esta hormona. La resistencia a la insulina puede ser inducida por el fallo en la vía de señalización de la insulina en múltiples niveles.

Un factor esencial que contribuye a la resistencia a la insulina es la fosforilación en residuos de serina en el IR, lo cual reduce la habilidad de esta proteína para atraer a PI3K, lo que minimiza su activación y puede acelerar la degradación del IR. Esta fosforilación en residuos de serina, a su vez, disminuye la fosforilación en residuos de tirosina del IRS-1, afectando los efectores de la vía de señalización por debajo de este punto (Soumaya, 2012).

Estudios recientes han demostrado una asociación entre los ácidos grasos libres y PKCs la cual induce resistencia a la insulina. Esta asociación podría ser causante de la fosforilación en residuos de serina del IR. El IR es el principal receptor dañado por los ácidos grasos libres deteriorando la actividad de la insulina en tejidos blanco de esta hormona (Soumaya, 2012).

Como se mencionó anteriormente, tanto el sobrepeso como la obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina y DM tipo 2. En un individuo con un peso sano el tejido adiposo secreta adiponectina, hormona que es secretada únicamente por el tejido adiposo, dicha secreción mejora la sensibilidad a la insulina, lo que se ve reflejado en la disminución de la producción de glucosa por parte del hígado y aumento en el consumo de glucosa tanto en el músculo como en el tejido adiposo. Sin embargo, en un individuo obeso los adipocitos se vuelven hipertróficos (aumento de tamaño) y se infiltran macrófagos y en conjunto secretan citocinas proinflamatorias, principalmente resistina, TNF- α e IL-6 y a su vez disminuye la secreción de adiponectina y se aumenta la liberación de ácidos grasos (Figura 10) (Soumaya, 2012).

La liberación de ácidos grasos promueve la intolerancia a la glucosa: en el hígado aumenta tanto la oxidación de ácidos grasos como la gluconeogénesis, en el músculo disminuye la captación y consumo de glucosa y en el páncreas se da la apoptosis de las células β debido al estado hiperinsulinémico inicial que conlleva a la disfunción de estas células disminuyendo la secreción de insulina en estados avanzados de la enfermedad con su posterior apoptosis (Figura 11) (Ginter & Simko, 2012).

La liberación de adipocinas proinflamatorias por parte del tejido adiposo conlleva a un estado de inflamación crónica, dicha inflamación tiene un papel central en el desarrollo de resistencia a la insulina y DM tipo 2 e incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares asociadas con la obesidad (Figura 10) (Soumaya, 2012).

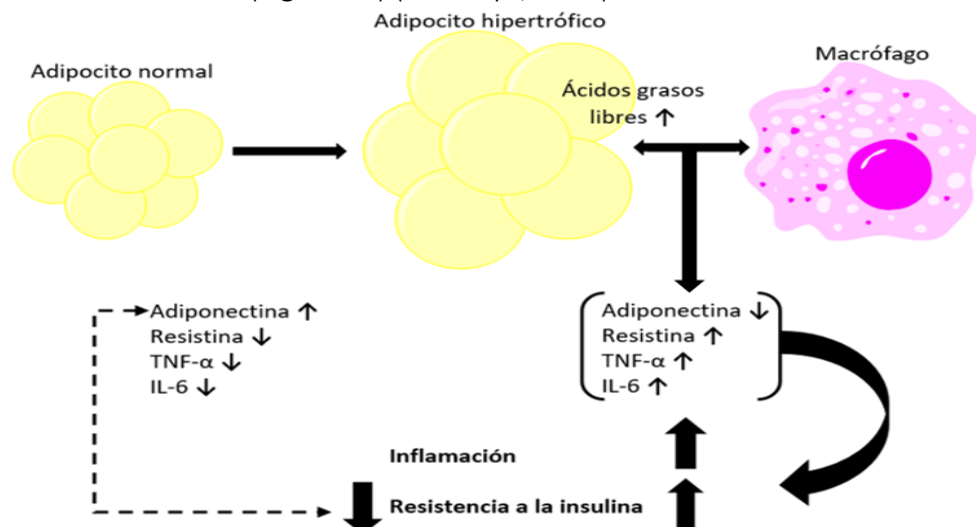


Figura 10: La disfunción del adipocito está vinculada con el desarrollo de resistencia a la insulina. Tanto la liberación de ácidos grasos como la de citocinas proinflamatorias por parte del adipocito hipertrófico, así como la disminución de adiponectina, afecta a los tejidos periféricos, lo cual conlleva a la resistencia a la insulina en un individuo obeso.

Tomada y modificada de abajo Soumaya, K. (2012). Capítulo 19: Molecular Mechanisms of insulin resistance in Diabetes. En S. I. Ahmad (Ed.). Diabetes: An Old disease, a New Insight.

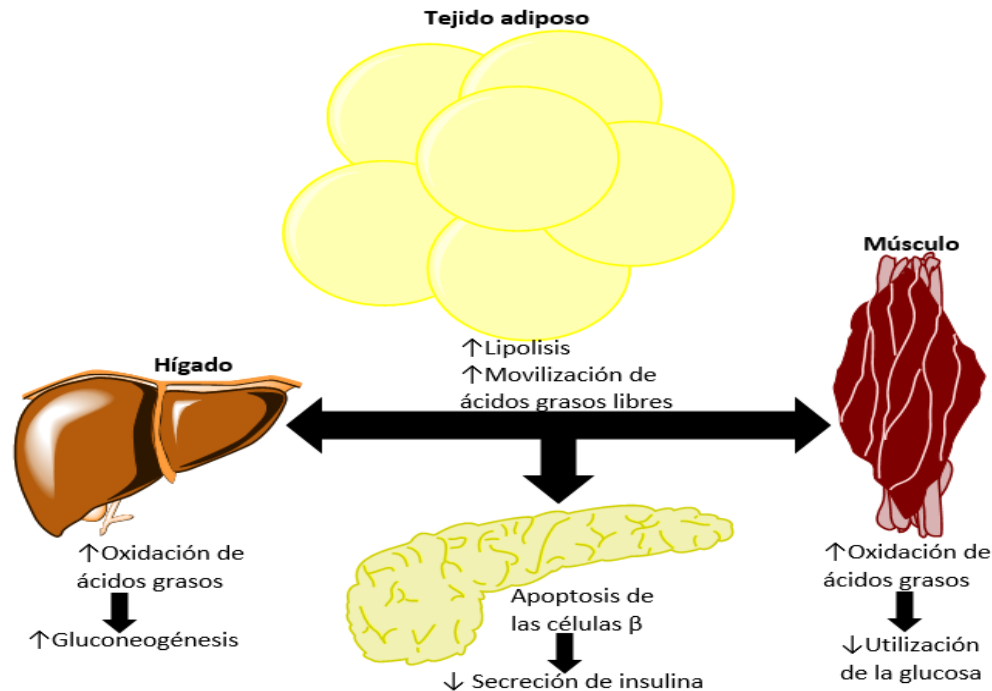


Figura 11: Efectos del aumento en la concentración de ácidos grasos libres en tejidos periféricos. El incremento de la lipólisis deteriora la utilización de la glucosa en el músculo y aumenta la síntesis de *novo* de glucosa por parte del hígado.

Tomada y modificada de Ginter & Simko (2012). Capítulo 6: Type 2 Diabetes mellitus pandemic in 21st Century. En S.I. Ahmad (Ed.). Diabetes: An Old disease, a New Insign.

- Sintomatología

Los síntomas de la DM tipo 2 son: aumento de la sed (polidipsia), micción frecuente (poliuria), cansancio, cicatrización lenta, infecciones frecuentes, entumecimiento de las extremidades. El diagnóstico de dicha enfermedad suele ser tardío ya que en muchos de los casos los síntomas pasan desapercibidos en etapas tempranas de esta enfermedad, debido a esto se calcula que entre un tercio o la mitad total de los casos de DM tipo 2 de población podrían estar sin diagnosticar (IDF, 2017).

En algunos pacientes el diagnóstico de DM tipo 2 se da después de haber presentado alguna complicación derivada de dicha enfermedad.

- Complicaciones

La DM está asociada con el incremento en el riesgo a desarrollar complicaciones a las cuales se le atribuyen la morbilidad y mortalidad de los pacientes. El bajo control de la glucemia y de la presión sanguínea conlleva a complicaciones que afectan los vasos sanguíneos grandes (complicaciones macrovasculares) y los vasos sanguíneos pequeños (complicaciones microvasculares) (Figura 12) (Kaul et al., 2012).

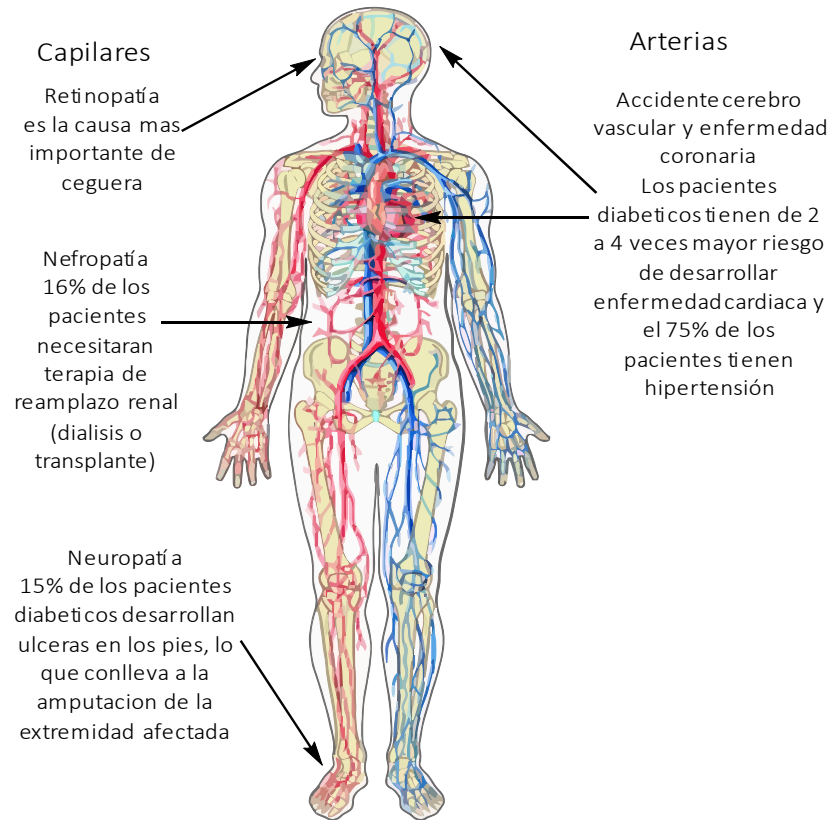


Figura 12. Complicaciones asociadas con la DM tipo 2. Complicaciones microvasculares derivadas de las lesiones a los capilares y complicaciones macrovasculares consecuencia de los daños a las arterias. Tomada y modificada de de Kaul et al., (2012). Capítulo 1: Introduction of Diabetes mellitus. En S. I. Ahmad (Ed.). Diabetes: An Old disease, a New Insight.

Complicaciones microvasculares: entre ellas se encuentran las lesiones oculares conocidas como retinopatía es una causa importante de ceguera y discapacidad visual, esta complicación es causada por el daño de los vasos sanguíneos de la capa posterior del ojo. La nefropatía es causada por las lesiones de los vasos sanguíneos pequeños de los riñones, provoca insuficiencia renal y es una causa importante de diálisis y trasplantes renales, si no es tratada a tiempo puede causar la muerte. El pie diabético es una de las infecciones más comunes entre los pacientes diabéticos, es causada por las lesiones de los nervios con su consecuente pérdida de sensibilidad (neuropatía), si la infección es grave termina con la amputación de la extremidad (OMS, 2018).

Complicaciones macrovasculares: la hiperglucemia crónica característica de la DM tipo 2 daña los vasos sanguíneos a través del proceso conocido como aterosclerosis o endurecimiento y obstrucción de las arterias, las lesiones en los vasos sanguíneos grandes y el estrechamiento de las arterias del sistema circulatorio pueden reducir el flujo de sangre, lo cual, incrementa de dos a cuatro veces la posibilidad de sufrir accidente cerebro vascular, enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica que puede provocar ulceración y gangrena con la posterior pérdida de extremidades por amputación (Kaul, 2012) (OMS, 2018).



-Diagnóstico

De acuerdo a la ADA (2018) existen cuatro pruebas que sirven para el diagnóstico de la DM tipo 2, cada prueba debe de llevarse a cabo dos veces para confirmar el diagnóstico.

1. A1C o HbA1C (Hemoglobina glicada): esta prueba cuantifica el promedio de glucosa sanguínea durante los últimos tres meses, cuando la HbA1C es igual o mayor a 6.5% el diagnóstico es positivo, se debe realizar una segunda cuantificación de HbA1C para confirmar el diagnóstico.

2. Glucosa plasmática en ayuno: para que se pueda realizar esta prueba, la persona necesita tener un ayuno mínimo de 8 horas, se diagnostica DM tipo 2 cuando la glucosa plasmática es igual o mayor a 126mg/dl.

3. Prueba de tolerancia a la glucosa oral: tiene una duración de dos horas, antes de iniciar dicha prueba se cuantifica la glucosa sanguínea, después se da la ingesta de 75 gramos de glucosa, si al término de la prueba los niveles glucémicos son iguales o mayores a 200mg/dl se diagnostica diabetes. Esta prueba indica como el paciente procesa la glucosa.

4. Prueba de glucosa casual o aleatoria: se cuantifica glucosa sanguínea a cualquier hora del día, el diagnóstico es positivo a DM tipo 2 cuando la medida es igual o mayor a 200mg/dl.

Hay otros parámetros a considerar, los cuales son, triglicéridos ≥ 150 mg/dl, HDL ≤ 40 mg/dl en hombres y ≤ 50 mg/dl en mujeres y presión arterial $\geq 140/90$ mm Hg (Rosas,2009).

Los rangos en una persona prediabética son los siguientes:

- Valores de A1C o HbA1C: entre 5.7% y 6.4%
- Valores de glucosa sanguínea en ayuno: entre 100 a 125 mg/dl
- Valores de glucosa sanguínea después de la prueba de tolerancia a la glucosa oral: entre 140 a 199mg/dl

-Tratamiento

El tratamiento de la DM tipo 2 consiste en dieta y ejercicio en conjunto con la ingesta de hipoglucemiantes orales, estos fármacos pueden ser usados solos o en combinación con otro hipoglucemiante oral o en combinación con insulina para lograr niveles glucémicos adecuados. A continuación, se describen brevemente los principales hipoglucemiantes utilizados por los pacientes con dicha enfermedad (Figura 13).

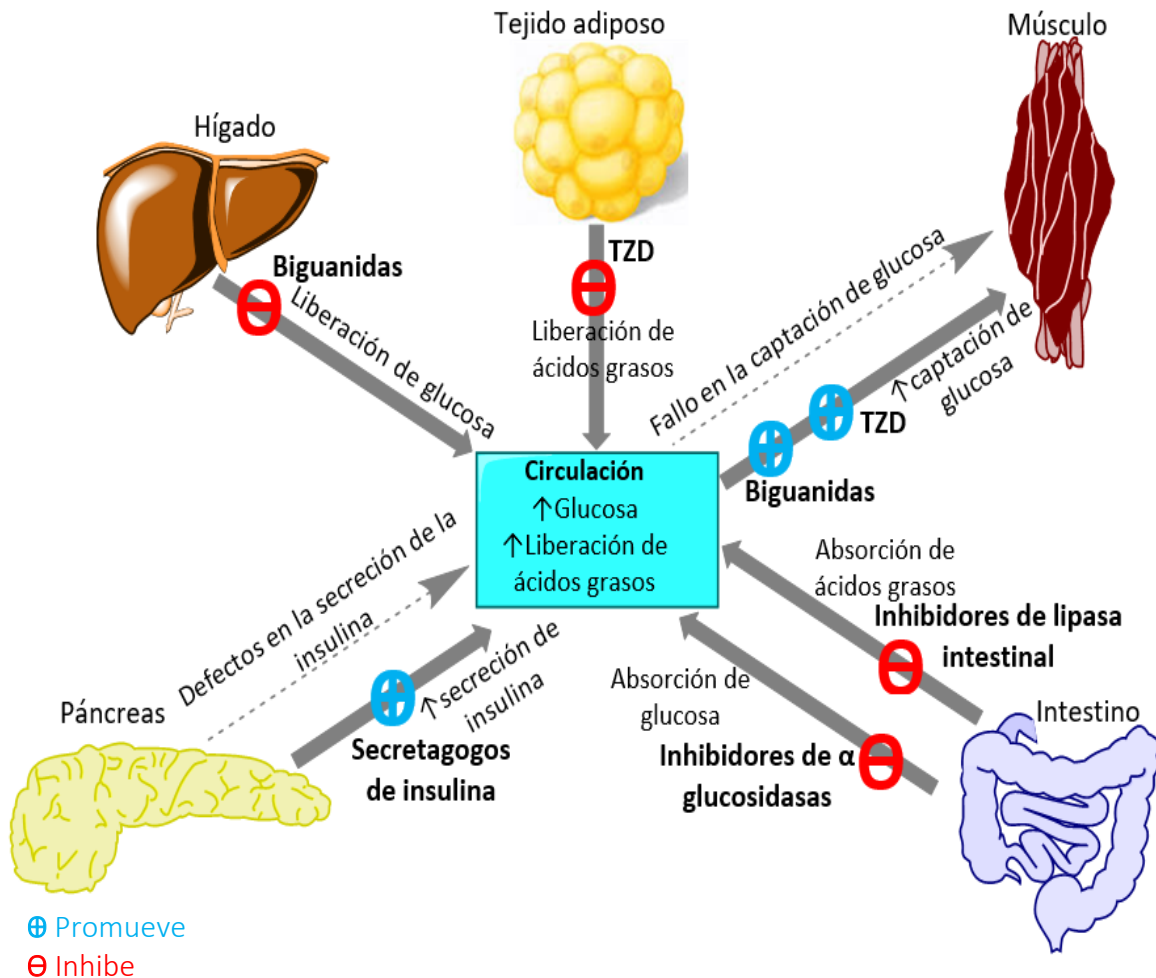


Figura 13: Principales órganos blanco y acción de los hipoglucemiantes orales más utilizados en el tratamiento de la Diabetes mellitus tipo 2. Biguanidas: inhiben la producción hepática de glucosa y mejoran la captación de la misma en el músculo esquelético. Inhibidores de α glucosidasas: retrasan la absorción de los carbohidratos inhibiendo a las enzimas encargadas de romper los polisacáridos. Secretagogos de insulina: aumentan la liberación de los gránulos preformados de insulina de las células β pancreáticas. Inhibidores de la lipasa intestinal: inhibe la hidrólisis de los lípidos ingeridos en la dieta. Tiazolidinedionas (TZD): mejoran la sensibilidad a la insulina de los tejidos blanco de esta hormona por lo tanto mejoran la captación de glucosa en el músculo y en el tejido adiposo inhiben la liberación de ácidos grasos. Modificada de Cheng & Fantus (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus.



Tabla 1: Principales hipoglucemiantes orales utilizados en el tratamiento de la DM2. (Cheng & Fantus, 2005).

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Disminución en la HbA1c	Efectos secundarios	Contraindicaciones
Inhibidor de α-glucosidasas (acarbose)	Retraso en la absorción de glucosa a nivel intestinal	25 mg una vez al día	0.5% - 1.0%	Gastrointestinal	Síndrome del intestino irritable, disfunción severa renal y/o hepática
Biguanidas (metformina)	Incrementa la sensibilidad a la insulina de músculo e hígado, disminuye la producción de glucosa hepática	500 mg una vez al día	1.0% - 1.5%	Gastrointestinal, acidosis láctica	Disfunción moderada a severa cardíaca y/o hepática, disfunción renal moderada
Sulfonilureas (glibenclamida)	Incrementa la secreción de insulina	5 mg una vez al día	1.0% - 1.5%	Hipoglucemia y ganancia de peso	Disfunción moderada a severa hepática y/o renal
Meglitinidas (repaglinida)	Incremento agudo de la secreción de insulina	0.5 – 4 mg tres veces al día	1.0% - 1.5%	Hipoglucemia y ganancia de peso	Disfunción severa renal y/o hepática, se recomienda no ingerir con gemfibrozil
Tiazolidinedionas (pioglitazona)	Incrementan la sensibilidad a la insulina del tejido adiposo y músculo	15 – 45 mg una vez al día	1.0% - 1.5%	Ganancia de peso, anemia, edema pulmonar	Disfunción hepática severa
Inhibidor de lipasa intestinal (olistat)	Disminución de la absorción de grasas a nivel intestinal	120 mg tres veces al día	0.3% - 0.9%	Gastrointestinal, reduce la absorción de vitaminas y grasas solubles	Síndrome de mala absorción, coleostasis

Glibenclamida

En el presente trabajo se utilizó el fármaco glibenclamida como control positivo, por tal motivo se describen con más detalle sus características y su mecanismo de acción.

La glibenclamida es una sulfonilurea de segunda generación y es el secretagogo de insulina más utilizado para el tratamiento de la DM tipo 2. Su acción requiere de una gran masa de células β pancreáticas funcionales (alta capacidad insulinosecretora). La monoterapia con sulfonilureas produce una reducción en promedio de hemoglobina glicada de un 1% a un 1.5% y disminuye el riesgo de complicaciones micro y macrovasculares (Cheng y Fantus, 2005).

Los principales efectos secundarios que presenta es la hipoglucemia y la ganancia de peso, debido a que estimula la secreción de insulina, conlleva al agotamiento de las células beta pancreáticas. La dosis es de 5mg una vez al día, tiene una vida media de 10 horas, es absorbida en el intestino y se descompone en el hígado (Contreras 2004). En la actualidad hay tratamientos en conjunto con metformina para que los pacientes mantengan índices glucémicos óptimos.

Mecanismo de acción: su acción inicia cuando se une a la subunidad SUR1 del canal de potasio sensible a ATP (K_{ATP}). Dicha unión resulta en el cierre del canal de K^+ Kir 6.2 por lo tanto se ve inhibido el flujo de iones de potasio aumentando la concentración de este en el interior de la célula β pancreática, lo cual conlleva a la despolarización de la membrana, ingresa sodio y posteriormente se abren los canales de calcio dependientes de voltaje, al aumentar los niveles de calcio intracelular, éste causa contracciones en los microtúbulos resultando en la exocitosis de los gránulos de insulina próximos a la membrana plasmática (Figura 14).

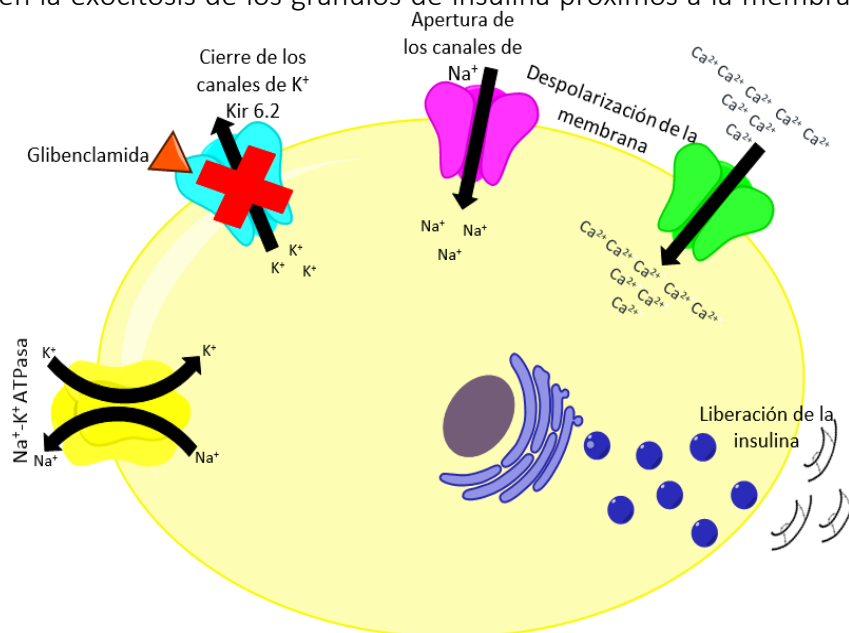


Figura 14: Mecanismo de acción de la glibenclamida. La glibenclamida se une a SUR1 del canal de K^+ sensible a ATP bloqueando dicho canal, al aumentar la $[K^+]$ ingresa Na^+ y se abren los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, aumenta la $[Ca^{2+}]$ intracelular y se liberan los gránulos preformados de insulina.

Tomada y modificada de Cheng & Fantus (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus.

3. Modelo STZ – NA (Masiello, 1998).

La estreptozotocina STZ (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa) es un antibiótico sintetizado por *Streptomyces achromogenes*. Este antibiótico está compuesto por dos fracciones: la metilnitrosourea que es la fracción citotóxica y una glucosa que es la fracción que le brinda especificidad a las células β pancreáticas. La STZ es utilizada para inducir diabetes experimental en animales, principalmente roedores. La STZ es selectivamente acumulada en las células β pancreáticas debido a que su ingreso a las células utiliza el transportador de glucosa de baja afinidad GLUT2, otros órganos que se ven dañados, pero en menor proporción que el páncreas, son el hígado y el riñón que también expresan GLUT2. Las células que no expresan este transportador de glucosa son resistentes a la estreptozotocina (Figura 15) (Lenzen, 2007) (Szkudelski, 2012).

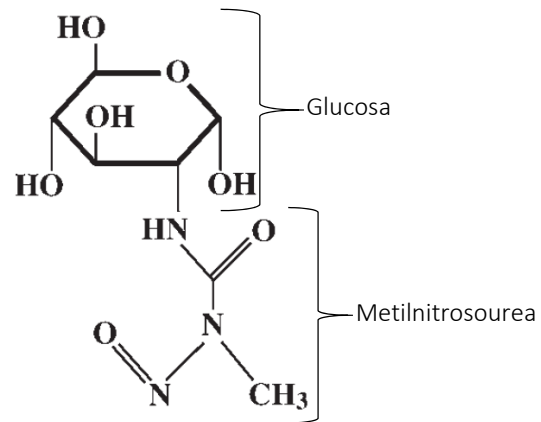


Figura 15: Estreptozotocina (STZ). La toxicidad de esta molécula radica en la transferencia de grupos metilos a la molécula del ADN, especialmente en la posición O6 de las guaninas, dañando el material genético. Al ser fragmentado el ADN, se sobreestimula la ADP ribosa polimerasa 1 (PARP-1), esta enzima reparadora del ADN utiliza NAD^+ para llevar a cabo su función, lo cual lleva a un desequilibrio energético ya que tanto los niveles de NAD^+ así como los de ATP son drásticamente disminuidos debido a esta sobreestimulación. La STZ también es capaz de metilar proteínas, pero la metilación del ADN es la principal causa de la muerte de las células β pancreáticas (Lenzen, 2007) (Szkudelski, 2012).

Tomada de Szkudelski (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model.

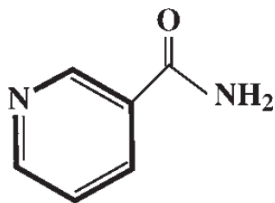


Figura 16: Nicotinamida (NA). El efecto protector de esta molécula se debe a que la PARP-1 tiene un sitio de unión a NAD^+ dicho sitio es ocupado por la NA inhibiendo la actividad reparadora de esta enzima impidiendo el desgaste energético. Aparte del efecto inhibitorio de la PARP-1, la NA incrementa los niveles intracelulares de NAD^+ (Szkudelski, 2012).

Tomada de Szkudelski (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model.

La nicotinamida NA (piridina-3-carboxamida) es la amida formada de vitamina B3 (niacina). Es la molécula que le brinda el efecto protector al modelo inhibiendo a la PARP-1 y es un precursor de ATP por lo tanto los niveles energéticos no se ven disminuidos de manera crítica, lo que resulta en mayor sobrevivencia celular (Figura 16) (Szkudelski, 2012).



4. Plantas con efecto hipoglucemiante

Andrade-Cetto & Heinrich en el 2005 reportaron 306 plantas utilizadas en México para el tratamiento de la diabetes con posible efecto hipoglucemiante las especies descritas pertenecen a 93 familias y 235 géneros.

Entre las familias que destacan se encuentran Asteraceae con 47 especies, Fabaceae con 27 especies, Cactaceae con 16 especies, Lamiaceae con 9 especies, Solanaceae y Euphorbiaceae con 10 especies.

En este listado destacan 7 especies, las cuales, son ampliamente utilizadas en México y cuentan con estudios tanto farmacológicos y fitoquímicos, estas especies son:

- *Cecropia obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae): se demostró su efecto hipoglucemiante en ratones diabéticos inducidos con aloxano, en conejos hiperglucémicos y en ratas diabéticas inducidas con STZ. Contiene gran cantidad de ácido clorogénico, el cual ha demostrado tener un efecto inhibitorio de la gluconeogénesis.
- *Equisetum myriochaetum* Schlecht & Cham (Equisetaceae) es utilizada para tratar enfermedades de los riñones y la diabetes, demostró tener efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas inducidas con STZ y en pacientes con DM tipo 2.
- *Acosmium panamense* (Benth) Yacolev (Fabaceae) es utilizada para tratar la fiebre, la malaria y en las recientes décadas, la diabetes. Su efecto hipoglucemiante se demostró en ratas diabéticas inducidas con STZ.
- *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae): su efecto hipoglucemiante se comprobó en conejos hiperglucémicos y en ratones diabéticos inducidos con aloxano.
- *Agarista mexicana* (Hemsl.) Judd (Ericaceae): tanto el extracto como algunos compuestos aislados de esta planta mostraron tener efecto hipoglucemiante en ratones y ratas normoglucémicas e hiperglucémicas.
- *Brikellia veronicaefolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae): su efecto hipoglucemiante se comprobó tanto en ratones normoglucémicos, así como en ratones diabéticos inducidos con aloxano.
- *Parmentiera aculeata* (Kunth) Seem. (Bignoniaceae): el efecto hipoglucemiante de esta planta se le atribuye a su fruto, dicho efecto se comprobó en ratones diabéticos inducidos con aloxano, la administración de este extracto fue administrado vía intraperitoneal.



También entre las especies documentadas en el mismo listado de Andrade-Cetto & Heinrich (2005) se encuentra *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M.King & H.Rob. a continuación, se describe con más detalle dicha planta, ya que es la que se evaluó en el presente trabajo.

4.1. *Ageratina petiolaris*

- Nombres comunes: amargocilla, amargosillo, hierba amargosa, hierba del burro, hierba del perro, pésto, peísto grande y sopa. En el lugar donde se colectó (Tenancingo, Estado de México) se le conoce como hierba del ángel o su nombre en nahuatl “Yolochíchil” o “Yolochichol” (Bustos-Brito et al., 2016) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana).

- Uso tradicional: trastornos digestivos, afecciones hepáticas, dolor en los riñones y es empleada como purgante, además se encuentra en el listado de las 306 plantas mexicanas con efecto hipoglucemiante usadas en el tratamiento de la diabetes publicado por Andrade-Cetto & Heinrich, 2005 (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana).

- Características morfológicas: es un arbusto de hasta 2 metros de largo, hojas opuestas triangulares largas, flores color blanco dispuestas en cabezuelas compuestas de entre 35 a 40 flores (Figura 17).

Ageratina petiolaris o su sinónimo *Eupatorium petiolare* es una planta endémica de México ampliamente distribuida en el centro y sur del país, principalmente en estados donde el clima es cálido, semicálido, semiseco y templado. Crece desde los 900 a 3900 metros sobre el nivel del mar. Se asocia al bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña y a bosques de pino-encino (figura 18).

Información taxonómica

División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Compositae (Asteraceae)
Género	<i>Ageratina</i>
Especie	<i>Ageratina petiolaris</i>
Nombre científico	<i>Ageratina petiolaris</i> (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob.

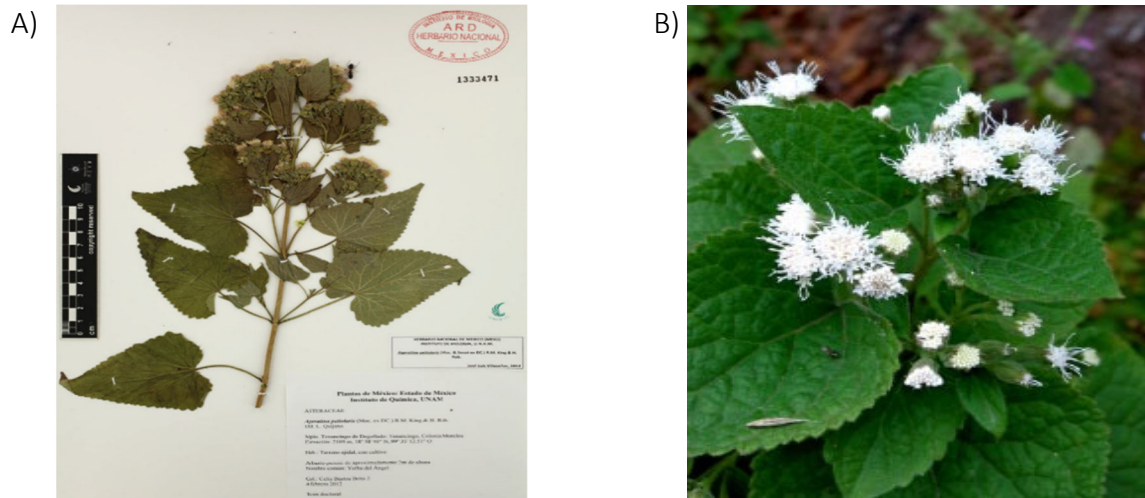


Figura 15: *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob. A) Ejemplar de herbario del Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.) R.M. King & H. Rob., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. B) *Ageratina petiolaris* foto tomada de naturalista, 2018.



Figura 16: Distribución geográfica de *Ageratina petiolaris* o *Eupatorium petiolare*. La distribución de esta especie se da principalmente en el centro y sur de la república, se localiza en estados como Coahuila, Durango, Chihuahua, Jalisco, San Luis potosí, Estado de México (Lugar de la colecta: Tenancingo), Michoacán, Puebla, Veracruz y Oaxaca.

- Antecedentes fitoquímicos

Bustos-Brito, 2016 purificó e identificó dos compuestos mayoritarios del extracto acuoso de *A. petiolaris* a los cuales se les confiere la actividad hipoglucemiante que tiene esta planta. Los compuestos identificados fueron el ácido clorogénico (Figura 19) y el L-quirositol (Figura 20), los cuales se describen a continuación:

- Ácido clorogénico (Figura 19): es conocido por ser uno de los componentes bioactivos de una gran variedad de plantas, se le ha adjudicado propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Este compuesto tiene efectos positivos sobre la homeostasis de la glucosa debido a esto podría ser utilizado como tratamiento de la DM tipo 2 (Dillenburg et al., 2017).
- L-quirositol (L-*chiro*-inositol) (Figura 20): La distribución del L-quirositol está limitada en la naturaleza, el aislamiento de este compuesto solo se ha llevado a cabo en pocas especies, tales como *Cremanthodium ellisii*, *Euphorbia resinifera*, *Euphorbia pilulifera* y *Ageratina petiolaris* (Bustos-Brito, 2016). También se ha reportado que el género *Syringodium* (algas marinas) acumula L-quirositol y se logró aislar este compuesto en la especie *Syringodium filiforme* (Nussier et al., 2008).

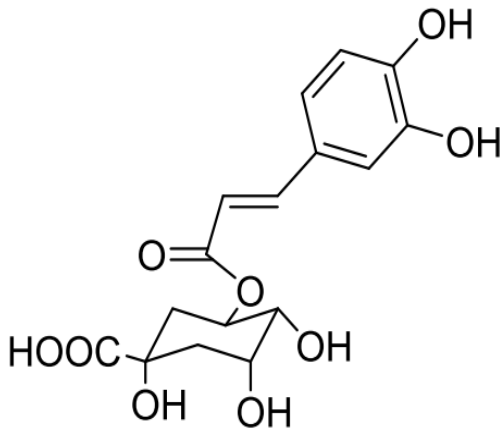


Figura 17: Ácido clorogénico.

Tomada de Bustos-Brito (2016). Tesis de doctorado: Aislamiento, determinación estructural y evaluación de la actividad biológica de metabolitos secundarios de especies del género *Ageratina*.

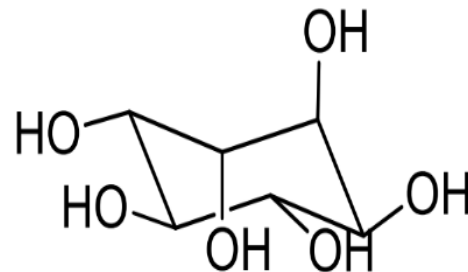


Figura 18: L-quirositol (L-*chiro*-inositol).

Tomada de Bustos-Brito (2016). Tesis de doctorado: Aislamiento, determinación estructural y evaluación de la actividad biológica de metabolitos secundarios de especies del género *Ageratina*.



- Antecedentes *farmacológicos*

Bustos-Brito y colaboradores (2016) reportaron el efecto hipoglucemiante en ratas STZ-NA tanto del extracto acuoso como metanólico de la parte aérea de *Ageratina petiolaris*, donde el extracto acuoso a una dosis de 160 mg/kg presentó efecto hipoglucemiante a partir de los 60 minutos.

Espinoza-Hernández en el 2017 reportó el efecto inhibitorio de la gluconeogénesis por parte del extracto acuoso de *A. petiolaris*, dicho extracto disminuyó en un 30% el pico hiperglucémico en la prueba de tolerancia a piruvato utilizada para observar los efectos sobre la gluconeogénesis, el efecto hipoglucemiante se mantuvo por 90 minutos en dicho experimento. En el mismo trabajo de investigación, el mismo extracto inhibió en un 100% la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, sin embargo, para observar dicho efecto inhibitorio se necesitó una concentración muy alta de extracto.

- Antecedentes farmacológicos de los compuestos mayoritarios

Ácido clorogénico

El mecanismo por el cual este compuesto presenta efecto hipoglucemiante es mediante la inhibición de la producción de glucosa hepática, la presencia de dicho compuesto se ha reportado en *Cecropia obtusifolia* (guarumbo) que es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la DM tipo 2 (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005) El efecto que presenta este compuesto esta dado principalmente por la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa, de hecho, es utilizado como control positivo en ensayos de inhibición de esta enzima (Espinoza-Hernández, 2017)

L-quirositol

Bustos-Brito (2016) aisló, purificó, identificó y probó este compuesto en ratas STZ-NA, donde el L-quirositol tuvo efecto hipoglucemiante a partir de los 60 minutos después de su administración.

En general los inositoles actúan como segundos mensajeros de membrana en la secreción de insulina. El enantiómero D-quirositol tiene propiedades hipoglucemiantes y es utilizado como tratamiento para la resistencia a la insulina presentada en la DM tipo 2 y también incrementa la secreción de insulina en pacientes con ovario poliquístico (Nuissier et al., 2008).

Yap y colaboradores en el 2007 realizaron un estudio con miotubos de ratas L6 (sistema de modelo in vitro) donde el D-quirositol, el L-quirositol, el epi-inositol y el muco- inositol mostraron incrementar la captación de glucosa con una concentración de 0.1 nM en estos cultivos por un incremento en la translocación de GLUT4, al igual que en un modelo ex vivo en músculo esquelético donde observaron el mismo efecto con un tratamiento de 1 mM (efecto similar que 100 nM de insulina).



METODOLOGÍA

1. Elaboración del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris*

La planta fue colectada en el municipio de Tenancingo Estado de México y un ejemplar de herbario fue depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM IBUNAM:MEXU:1333471. El material vegetal fue proporcionado por la Dra. Celia Bustos Brito, departamento de productos Naturales del Instituto de Química, UNAM.

Para preparar el extracto se utilizaron 25 g de la parte aérea de la planta molida de *A. petiolaris*, la cual se colocó en 500 mL de agua destilada en ebullición y se retiró de la fuente de calor, y posteriormente se agitó por 15 minutos. Transcurridos los 15 minutos se dejó reposar la mezcla por 5 minutos antes de filtrarla con ayuda de tierra de diatomeas y vacío, posteriormente el extracto se congeló a -40°C y se liofilizó (LABCONCO FreeZone 2.5) hasta obtener el producto seco.

1.1. Obtención del L-quiuroinositol del extracto acuoso

El compuesto puro utilizado en el presente trabajo fue proporcionado por la Dra. Celia Bustos Brito del Instituto de química, la metodología empleada para aislar el compuesto se describe en la tesis de doctorado de Bustos-Brito, 2016: Aislamiento, determinación estructural y evaluación de la actividad biológica de metabolitos secundarios de especies del género *Ageratina*.

Se comprobó por técnicas espectroscópicas y espectrométricas la presencia del compuesto en el extracto utilizado en el presente trabajo.

2. Evaluación del efecto de los tratamientos in vivo

Se utilizaron 6 ratas de la cepa Wistar, ambos sexos, para cada grupo de aproximadamente 60 días de edad con un peso aproximado de 200 g, las cuales permanecieron con un fotoperiodo 12/12, a una temperatura de 25°C y 50% de humedad, con agua y alimento ad libitum, antes de la administración de los tratamientos se sometieron a un ayuno de 12 horas.

2.1. Inducción de hiperglucemia (modelo STZ-NA)

Se administraron 150 mg/kg de nicotinamida (NA) vía intraperitoneal y 15 minutos después de la administración de la NA se administraron vía intravenosa (vena caudal) 65 mg/kg de estreptozotocina (STZ).

Las ratas con niveles glucémicos entre 300 y 400mg/dL sin ayuno fueron utilizadas para los grupos hiperglucémicos (los niveles glucémicos con ayuno de 12 horas de estas ratas estaban alrededor de los 170 a 210 mg/dL).

2.1.1. Administración de tratamientos

Se realizaron ensayos agudos con duración de 150 minutos. Los tratamientos fueron administrados después de medir glucosa basal (T0) posteriormente se realizaron mediciones a los 60, 90, 120 y 150 minutos después de la administración del tratamiento (Tabla 2)



Tabla 2: Grupos experimentales con su respectivo tratamiento (n=6).

Grupo	Tratamiento
Normoglucémico (N)	Solución fisiológica (p.o)
Hiperglucémico (H)	Solución fisiológica (p.o)
Hiperglucémico + glibenclamida (HG)	5 mg/kg de glibenclamida (Euglucon) (p.o)
Hiperglucémico + extracto acuoso de <i>Ageratina petiolaris</i> (HE)	160 mg/kg de extracto acuoso de <i>Ageratina petiolaris</i> (p.o)
Hiperglucémico + L-quirositol (HL)	3.73 mg/kg de L-quirositol (p.o)

- Cuantificación de glucosa

Las mediciones de glucosa sanguínea fueron realizadas tomando una gota de sangre extraída de la vena caudal de la rata, la cuantificación de glucosa se llevó a cabo mediante tiras reactivas y dos aparatos de la marca Accutrend Plus de Roche, los cuales determinan los niveles glucémicos a través del cambio de color dado en la tira el cual se da por la oxidación de la glucosa mediada por la enzima glucosa oxidasa.

- Cuantificación de insulina

Para la cuantificación de la concentración plasmática de insulina se recolectaron aproximadamente 60 μ L de sangre obtenida de la vena caudal de la rata, las muestras sanguíneas se centrifugaron por 10 minutos a 12 000 rpm y los sueros se almacenaron a -40°C hasta el momento de la cuantificación.

La cuantificación de insulina se llevó a cabo mediante el equipo de microelisa Awareness® con el reactivo de ELISA "Rat/Mouse Insulina kit" Milipore Corporation, el cual contiene todas las soluciones utilizadas en la cuantificación.

Pasos para llevar a cabo la técnica de ELISA para la cuantificación de insulina

1. Lavado de pozos: se agregaron a los pozos de la prueba 300 μ L de buffer de lavado y se decantó, este paso se realizó por triplicado.

2. Se añadieron 10 μ L de buffer de ensayo a cada pozo.

3. Al primer pozo de la placa (pozo del blanco) se le añadieron 10 μ L de solución matriz, los siguientes 8 pozos correspondieron a la curva patrón, donde se agregaron 10 μ L de las soluciones contenidas en el kit 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 ng de insulina y los controles de calidad QC1 y QC2, los pozos siguientes se les añadieron 10 μ L de muestra de suero, todos con sus correspondientes duplicados.

4. Se agregaron a cada pozo 80 μ L de anticuerpo de detección, posteriormente se colocó una mica adherible contenida en el kit a la placa.



5. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación constante utilizando el incubador/agitador de micro platos Stat Fax 2200 Awareness Technology

6. Transcurrido el tiempo de incubación se decantó el contenido de la placa y posteriormente se realizó el lavado de los pozos (Paso 1).

7. Se añadieron 100 μ L de solución de enzima, se cubrió con la misma mica adherible y se incubó durante 30 minutos con agitación constante en el incubador/agitador de micro platos Stat Fax 2200 Awareness Technology.

8. Pasado el tiempo de incubación con la solución enzima se decantó el contenido y se realizó el lavado de los pozos como el paso uno, solo que en este paso se realizaron 6 lavados.

9. Después de los lavados se agregaron 100 μ L de sustrato (reacción es fotosensible) y se incubó durante quince minutos en el incubador/agitador de micro platos Stat Fax 2200 Awareness Technology.

10. Transcurrido los quince minutos de incubación a cada pozo se agregaron 100 μ L de solución de paro a lo ya contenido en los pozos.

11. La placa se leyó a una longitud de onda de 405-630 nm con el lector de micro platos Stat Fax 3200 Awareness Technology.

3. Análisis estadístico

- Glucosa

Los niveles de glucosa fueron analizados a través de una ANOVA de una vía con un valor de significancia de $p \leq 0.05$ seguida de una prueba de comparaciones múltiples Tukey.

Tanto el análisis estadístico como el gráfico se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.0.

- Insulina

Para la conversión de las absorbancias a ng/mL se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.0 y las absorbancias se ajustaron a una curva sigmoidea de 4 parámetros para realizar dicha conversión.

Debido a las variaciones en las concentraciones de glucosa en el tiempo cero intragrupal y entre grupos se normalizó con el T0 de cada individuo experimental, posteriormente se calcularon la media, desviación y error estándar de cada grupo a partir de dicha normalización. Se realizó una prueba de t student con un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

Tanto el análisis estadístico como el gráfico se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.0.



RESULTADOS

- Glucosa

Tabla 3: Valores de glucosa plasmática (mg/dL) de los grupos experimentales (n=6). Se muestra el promedio \pm ESM de los grupos Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + Glibenclamida (HG), Hiperglucémico + Extracto (HE) e Hiperglucémico + L-quiuroinositol (HL). *: diferencia significativa respecto a T0, a: diferencia significativa con grupo H $p \leq 0.05$.

	T0	T60	T90	T120	T150
N	117 \pm 2a	118 \pm 3a	111 \pm 3a	115 \pm 4a	117 \pm 3a
H	180 \pm 4	195 \pm 6	193 \pm 5	194 \pm 5	184 \pm 6
HG	187 \pm 5	151 \pm 6*a	132 \pm 8*a	125 \pm 7*a	119 \pm 5*a
HE	176 \pm 3	160 \pm 4*a	159 \pm 4*a	150 \pm 5*a	142 \pm 5*a
HL	181 \pm 5	170 \pm 12	164 \pm 15	158 \pm 14a	151 \pm 13a

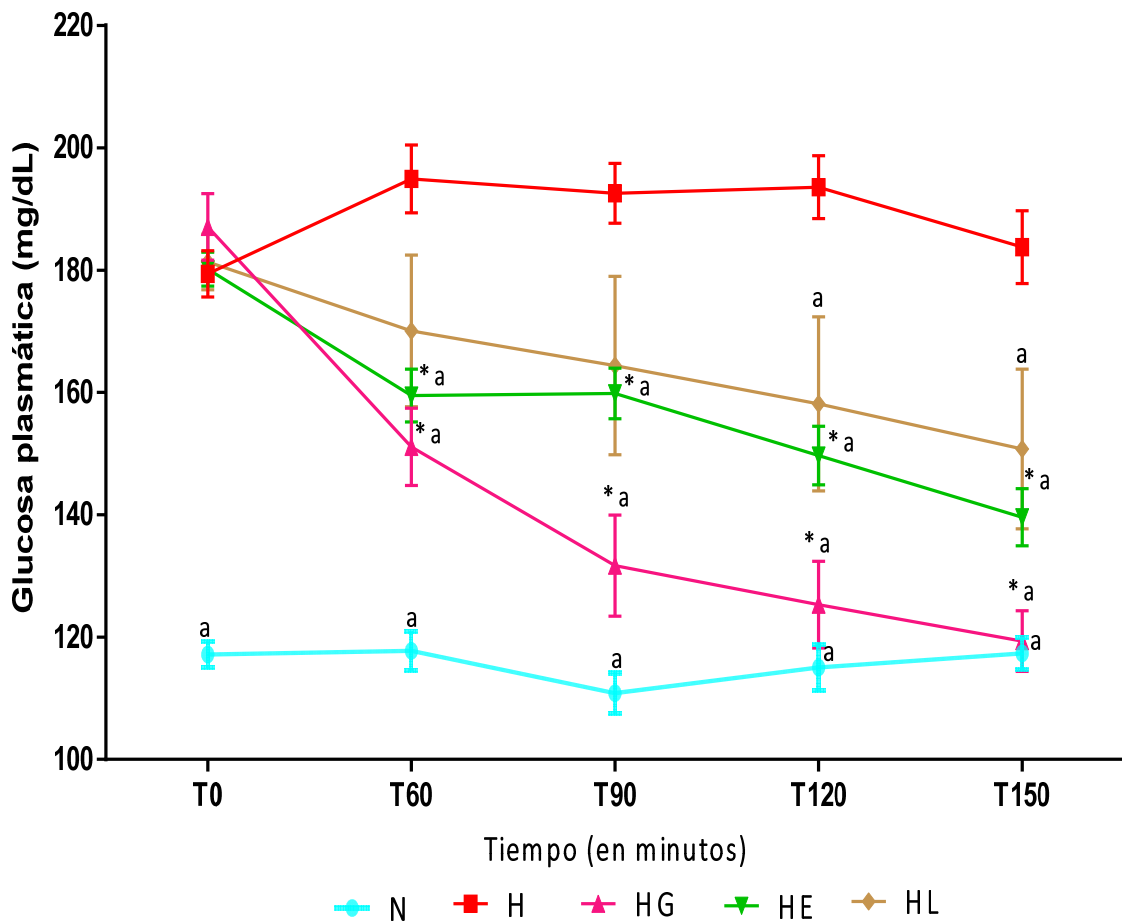


Figura 19: Valores de glucosa plasmática (mg/dL) de los grupos experimentales (n=6): Normoglucémico(N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + Glibenclamida (HG), Hiperglucémico + Extracto (HE) e Hiperglucémico + L-quiuroinositol (HL). Se muestra el promedio \pm ESM, *: diferencia significativa respecto a T0, a: diferencia significativa con grupo H $p \leq 0.05$.

Tanto el grupo Normoglucémico como el Hiperglucémico mantuvieron niveles glucémicos estables a lo largo de los 150 minutos que duró el experimento agudo (Tabla 3 y Figura 21),



y si se comparan los niveles de glucosa de ambos grupos se observa que los niveles están elevados en el grupo **H**, lo cual confirma que el modelo STZ-NA es un modelo que causa hiperglucemia y que estos niveles de glucosa se mantienen estables a lo largo del tiempo que duró este experimento ya que no se encontraron diferencias significativas en ningún tiempo.

En el grupo **HG** se encontró diferencia significativa comparándolo con su tiempo inicial a partir de los 60 minutos después de la administración de este fármaco (**Tabla 3**) la tendencia a la baja se puede observar en la **Figura 21**. Comparando este grupo con el grupo control **H** los niveles glucémicos del grupo **HG** son significativamente diferentes a los del grupo **H** a partir del T60. La administración de esta sulfonilurea baja tanto los niveles de glucosa sanguínea que llegan a niveles normoglucémicos en el T150 (**Figura 21**).

Analizando los resultados obtenidos con el grupo **HE**, se observó diferencia significativa a partir de los 60 minutos después de la administración del extracto acuoso de *A. petiolaris* si lo comparamos con su T0 (**Tabla 3**) y la tendencia a disminuir los niveles glucémicos se observa en la **Figura 21**. Si comparamos este grupo con el grupo control **H**, son significativamente diferentes a partir del T60, lo cual corrobora el efecto hipoglucemiante de este extracto.

En el grupo **HL** no hubo cambios estadísticamente significativos en los niveles glucémicos a lo largo de los 150 minutos que duró el experimento, pero comparando el grupo **HL** con el grupo control **H** los niveles glucémicos de ambos grupos son significativamente distintos a partir del T120 (**Tabla 3**) y se observa una tendencia a disminuir los niveles de glucosa plasmática por parte del compuesto (**Figura 21**).

- **Insulina**

Tabla 4: Valores de insulina plasmática (ng/mL) de los grupos experimentales (n=6). Se muestra el promedio \pm ESM de los grupos Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + Glibenclamida (HG), Hiperglucémico + Extracto (HE) e Hiperglucémico + L-quiuroinositol (HL). *: diferencia significativa respecto al T0, a: diferencia significativa con grupo H $p \leq 0.05$.

	T0	T60	T90	T120	T150
N	2.8 \pm 0.5	2 \pm 0.4	2 \pm 0.5	1.5 \pm 3*	1.4 \pm 0.3*
H	2 \pm 0.4	2 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3	1.6 \pm 0.4
HG	3.7 \pm 0.6a	6 \pm 0.5*a	6.2 \pm 0.7*a	5.7 \pm 0.7*a	5.4 \pm 0.7*a
HE	4.9 \pm 0.8a	4.3 \pm 0.6a	4.8 \pm 0.6a	4.7 \pm 0.5a	4.4 \pm 0.6a
HL	2.5 \pm 0.4	4 \pm 0.6*a	4 \pm 0.6*a	3.6 \pm 0.6a	3.8 \pm 0.5a

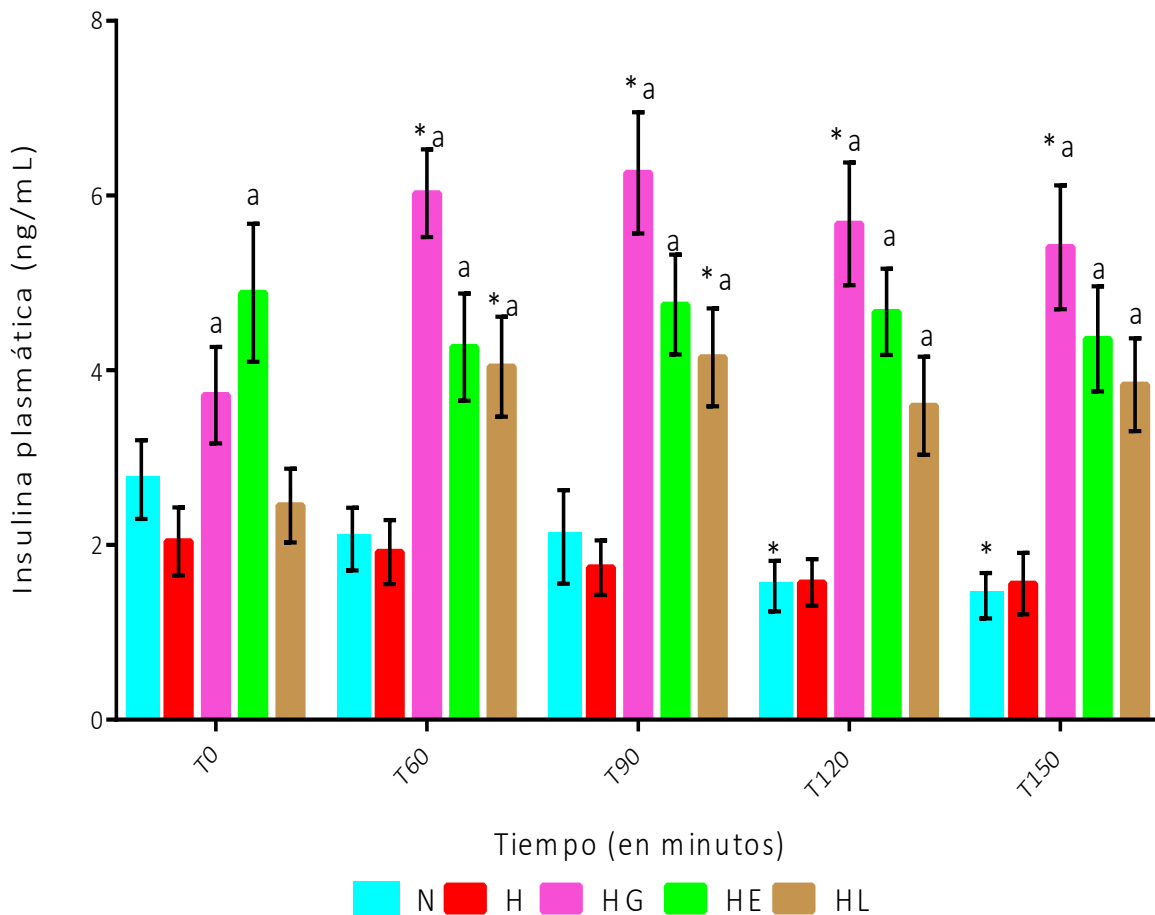


Figura 20:Figura 22. Valores de insulina plasmática (ng/mL) de los grupos experimentales (n=6). Se muestra el promedio \pm ESM de los grupos Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + Glibenclamida (HG), Hiperglucémico + Extracto (HE) e Hiperglucémico + L-quiuroinositol (HL). *: diferencia significativa respecto al T0, a: diferencia significativa con grupo H $p \leq 0.05$.

Al comparar los niveles de insulina plasmática en ng/mL de los grupos Normoglucémico y del grupo Hiperglucémico, no hubo diferencia estadísticamente significativa.



En el grupo **N** al comparar los niveles insulinémicos con respecto a su T0 se calculó diferencia a partir del T120, esta diferencia es debido a la disminución de insulina plasmática, los valores de esta disminución se pueden observar en la **Tabla 4**.

En el grupo **H** se mantuvieron estables los niveles de insulina plasmática en los 150 minutos del experimento, aunque se puede observar en la **Figura 22** que dichos niveles empiezan a disminuir a partir del T90, aunque este decremento no es estadísticamente significativo.

Analizando los valores del grupo **HG** se puede observar que los niveles de insulina en ng/ml se encuentran elevados a partir del T0 (**Tabla 4**), por lo tanto, dichos niveles no son comparables con el grupo **H** ya que no tuvo los mismos niveles de insulina al inicio del experimento, pero al comparar los niveles de insulina de todos los tiempos con respecto a su T0 son significativamente diferentes a partir del T60 debido al aumento en los niveles de insulina cuantificados (**Tabla 4** y **Figura 22**).

Los valores iniciales de insulina del grupo **HE** se encuentran elevados al igual que en el grupo **HG** por lo tanto no son comparables con el grupo **H** (**Tabla 4**). Los valores insulinémicos del grupo **HE** se mantuvieron estables en los 150 minutos del experimento, hubo oscilaciones en los niveles de insulina en algunos tiempos, pero no fueron estadísticamente diferentes (**Tabla 4** y **Figura 22**).

Analizando los valores de insulina plasmática del grupo **HL** se encontraron diferencias significativas en los tiempos 60 y 90 minutos después de la administración del compuesto respecto a su T0 debido a un aumento en la concentración plasmática de insulina (**Tabla 4** y **Figura 22**). Los niveles iniciales de insulina de los grupos **H** y **HL** no fueron estadísticamente diferentes, por lo tanto, si pueden ser comparables, el grupo **HL** fue estadísticamente diferente a partir del T60 al ser comparado con el grupo control **H**, se observa en la **Figura 22** que los niveles del grupo **H** están estables en todos los tiempos, pero en el grupo **HL** se elevan a partir del T60.

Tabla 5: Normalización de los valores de insulina de los grupos experimentales (n=6). Se muestra el promedio de los porcentajes + ESM de los grupos Normoglucémico (N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + Glibenclamida (HG), Hiperglucémico + Extracto (HE) e Hiperglucémico + L-quiuroinósitol (HL). *: diferencia significativa respecto a T0, a: diferencia significativa con grupo H p ≤0.05.

	T0	T60	T90	T120	T150
N	100	93 ± 19	71 ± 16*	53 ± 6*a	57 ± 8*
H	100	112 ± 18	93 ± 8	92 ± 11	80 ± 11*
HG	100	188 ± 17*a	186 ± 13*a	163 ± 9*a	155 ± 10*a
HE	100	105 ± 16	114 ± 13	120 ± 15	96 ± 5
HL	100	195 ± 33*a	198 ± 29*a	172 ± 30*a	202 ± 47*a

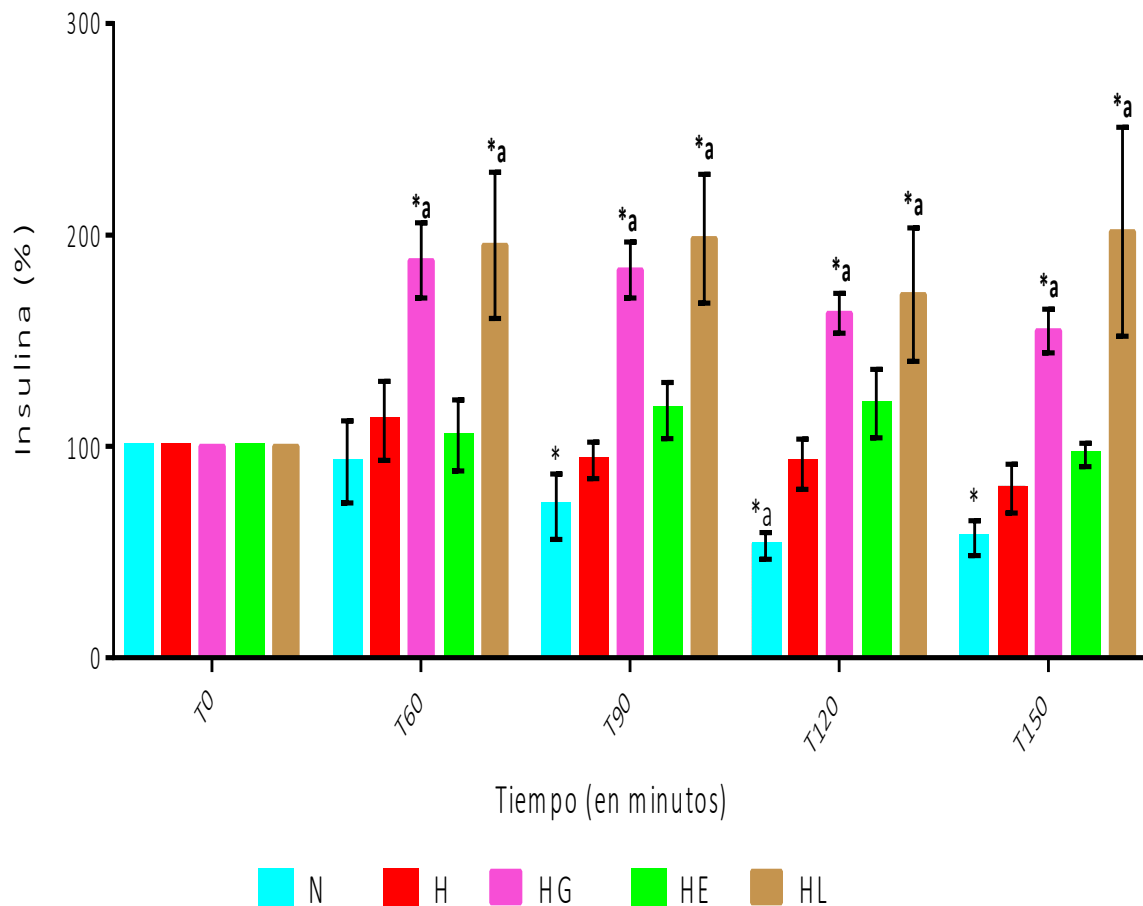


Figura 21: Normalización de los valores de insulina de los grupos experimentales (n=6). Se muestra el promedio de los porcentajes + ESM de los grupos Normoglucémico(N), Hiperglucémico (H), Hiperglucémico + Glibenclamida (HG), Hiperglucémico + Extracto (HE) e Hiperglucémico + L-quiuroinósitol (HL). *: diferencia significativa respecto a T0, a: diferencia significativa con grupo H p ≤0.05.



Debido a las variaciones de los niveles de insulina en el tiempo 0 de cada individuo experimental se normalizaron con el T0 cada uno de los valores de insulina y se calculó los parámetros estadísticos mostrados a partir de dicha conversión (ng/mL → porcentaje).

En el grupo Normoglucémico se calculó diferencia significativa a partir del T90 comparado con su tiempo inicial debido a la disminución de la concentración de insulina plasmática (**Tabla 2** y **Figura 22**). Los niveles de insulina fueron significativamente diferentes en el T120 al compararlos con el grupo **H** (**Tabla 4**).

Los niveles de insulina en el grupo **H** se mantuvieron estables hasta el T120, a los 150 minutos del experimento los niveles de insulina fueron significativamente diferentes al tiempo inicial debido a una disminución en la concentración de dicha hormona (**Tabla 4**).

En el grupo **HG** se calculó diferencia significativa a partir de los 60 minutos después de la administración del fármaco, aumentando hasta un 88% la secreción de insulina y manteniendo una secreción a lo largo de los 150 minutos del experimento al comparar los valores con el grupo **H** (**Tabla 4** y **Figura 22**).

Los niveles de insulina en el grupo **HE** se mantuvieron estables, no se calculó diferencia significativa a lo largo de los 150 minutos del experimento (**Figura 22**) y los valores no fueron significativamente diferentes a los del grupo control **H** (**Tabla 4**).

En el grupo **HL** hubo un aumento en la concentración plasmática de insulina de hasta un 202 % en el T150 si lo comparamos con el tiempo inicial (**Tabla 4**), se calculó diferencia significativa a partir de los 60 minutos después de la administración del compuesto. Todos los valores posteriores de la administración del tratamiento fueron significativamente diferentes al ser comparados con los niveles del grupo control **H**.



DISCUSIÓN

Con respecto a los resultados obtenidos en los niveles de glucosa, tanto la administración del fármaco como del extracto acuoso de *A. petiolaris*, presentaron efecto hipoglucemiante al ser comparados tanto con sus respectivos niveles iniciales de glucosa como al ser comparados con el grupo control Hiperglucémico.

Como se mencionó en los antecedentes farmacológicos de la planta, ya se había comprobado el efecto hipoglucemiante de *A. petiolaris* los resultados obtenidos en la presente investigación confirman dicho efecto. En otro estudio farmacológico del extracto se observó que inhibe la gluconeogénesis hepática y este efecto se le atribuye a la presencia del ácido clorogénico que es uno de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto acuoso (Espinoza-Hernández, 2017).

Bustos-Brito en el año 2016 aisló y probó el compuesto L-quirositol en ratas STZ-NA donde el compuesto mostró tener efecto hipoglucemiante a los 120 minutos después de su administración. En los resultados obtenidos en esta investigación, se observa que el compuesto tiene efecto hipoglucemiante, aunque no es estadísticamente significativo al comparar los niveles glucémicos con el tiempo inicial. Se obtuvo diferencia a partir de los 120 minutos al comparar los niveles glucémicos con el grupo control Hiperglucémico. Dichos resultados pueden deberse a que las ratas que se utilizaron en el presente trabajo de investigación tuvieron niveles glucémicos más altos sin ayuno (entre 300-400 mg/dl) y con un ayuno aproximado de 12 horas las glucemias de estas ratas estaban en los niveles glucémicos similares a las ratas sin ayuno que utilizó Bustos-Brito en su investigación.

El modelo de hiperglucemia crónica inducida por la administración de estreptozotocina como agente citotóxico y la nicotinamida como agente citoprotector se debe a la destrucción parcial de la masa de células β pancreáticas. Dicha destrucción no es controlable, debido a esto la glucemia de las ratas inducida por este modelo es variable al igual que la secreción de insulina.

Con respecto a los resultados de la cuantificación de insulina y debido a lo mencionado anteriormente, en este trabajo los niveles de insulina de las ratas hiperglucémicas fueron variables, por lo tanto, aparte del análisis estadístico realizado a los datos obtenidos de insulina en ng/mL, se decidió analizar dichos niveles de manera porcentual ya que en cada individuo de cada grupo con su respectivo tratamiento mostró una tendencia clara.

A pesar de esta variación se pudo realizar el análisis estadístico con respecto al tiempo inicial. Tanto en el grupo Normoglucémico como el Hiperglucémico los niveles insulinémicos se mantuvieron estables en los primeros tiempos de experimentación y posteriormente se observó una disminución de estos niveles, dicha disminución es más evidente al observar los valores de insulina de manera porcentual, en el caso del grupo **N** los niveles de insulina disminuyeron un 47 % y en el **H** los niveles de insulina disminuyeron un 20 %.



En el caso del grupo con glibenclámda, en todas las ratas administradas con el fármaco, se observó un aumento en la secreción de insulina a los 60 minutos de la administración (aumento en la secreción de un 88 %) y se observó diferencia significativa con respecto al T0. Los resultados obtenidos en la cuantificación de insulina concuerdan con el inicio del efecto hipoglucemiante del fármaco, ya que tanto el efecto secretor de insulina como el efecto hipoglucemiante se observaron a partir de los 60 minutos después de la administración de la sulfonilurea.

La administración del extracto acuoso de *A. petiolaris* estadísticamente no causó aumento en la concentración plasmática de insulina, pero se observó que los niveles de insulina no bajan de forma drástica como lo hacen las ratas del grupo Hiperglucémico, esta tendencia es más evidente al observar los valores y el gráfico de los porcentajes de insulina (**Tabla 5 y Figura 23**) a los 150 minutos hubo una disminución de un 4 % que es menor a lo observado en el grupo H, a los 120 minutos dada la administración del extracto se observó aumento de un 20 % en los niveles de insulina pero dicho aumento en ng/mL no fue estadísticamente significativo como se mencionó.

Analizando los resultados obtenidos del grupo **HL**, tanto de los niveles glucémicos como de la concentración de insulina plasmática, estadísticamente no concuerdan entre ellos. Se observó un aumento en la concentración plasmática de insulina a los 60 minutos y a los 90 minutos posteriores a la administración del compuesto y dicho aumento es estadísticamente significativo al comparar los niveles insulinémicos del tiempo inicial con estos tiempos, pero, como ya se mencionó, el efecto hipoglucemiante no fue significativamente diferente al comparar los niveles glucémicos iniciales con los demás tiempos, sin embargo, se observó una disminución de dichos niveles. A diferencia de los otros grupos de este experimento los niveles de insulina plasmática de este grupo si son comparables con el grupo control Hiperglucémico debido a que los niveles iniciales de insulina no son estadísticamente diferentes, con lo anteriormente mencionado los niveles insulinémicos del grupo HL son distintos al grupo H a partir de los 60 minutos de la administración del compuesto.

El incremento de la concentración plasmática de insulina por parte del compuesto es más evidente al observar los valores en porcentaje, el compuesto aumentó los niveles de insulina a un 195 % en el T60, a los 90 minutos aumentó a un 198 %, en el T90 aumentó a 172 % y a los 150 minutos después de la administración aumentó a 202 % la concentración de insulina plasmática.



CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del extracto acuoso de *Ageratina petiolaris* y uno de sus compuestos mayoritarios el L-quiuroinositol (*L-chiro*-inositol) aislado del extracto acuoso de dicha planta y se concluye lo siguiente:

1. Se corroboró el efecto hipoglucemiante por parte del extracto acuoso de la parte aérea *Ageratina petiolaris*.
2. La administración vía oral del L-quiuroinositol aumenta la concentración plasmática de insulina y tiene efecto hipoglucemiante tardío.
3. Por lo tanto, se puede concluir que uno de los mecanismos de acción por el cual actúa la planta *Ageratina petiolaris* es aumentar la concentración plasmática de insulina y que dicho aumento se puede adjudicar a la presencia del compuesto L-quiuroinositol.



REFERENCIAS

- American Diabetes Association. 2018. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*; 41(Suppl. 1): S13-S17.
- Andrade-Cetto A. Hienrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99, 325-48.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php
- Bustos-Brito, C. 2016. Tesis de doctorado: Aislamiento, determinación estructural y evaluación de la actividad biológica de metabolitos secundarios de especies del género *Ageratina*. Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bustos-Brito, C., Andrade-Cetto, A., Giraldo-Aguirre, J., Moreno-Vargas, A.D. & Quijano, L. 2016. Acute effect and phytochemical composition of *Ageratina petiolaris*. *Journal of Ethnopharmacology*. 185: 341-346.
- Cheng AY, Fantus IG. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*. Jan 18: 172(2): 213-26.
- Contreras Carmen. *Diabetes Mellitus*. 2ed., Mediterráneo, Chile, 2004, 468pp.
- De Fronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Frank, G.H., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D.C., Testa, M. A., & Weiss, R. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*. 1-22.
- Dillenburg-Meinhardt, A., Mateus-Damin, F., Caldeirão, L., Ferreira-Ferreira da Silveira, T., Teixeira-Filho, J. & Tedeira-Godoy, H. 2017. Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brasil. *Food Research International*. 99: 522-530.
- Espinoza-Hernández, F.A. 2017. Tesis de maestría: Efecto de los extractos de la raíz de *Smilax moralensis* M.Martens & Galeotti y de la parte aérea de *Ageratina petiolaris* (Moc. & Sessé ex DC.). R.M. King & H. Rob. sobre la gluconeogénesis hepática en ratas. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino ENSANUT MC. 2016. Secretaría de Salud Pública: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Federación Internacional de Diabetes. 2017 (8ª edición). *Diabetes Atlas de la FID*. International Diabetes Federation.
- Ginter, E. & Simko, V. 2012. Type 2 Diabetes mellitus pandemic in 21st Century. En S. I. Ahmad (Ed.). *Diabetes: An Old disease, a New Insight*. (pp 42- 50). Nottingham, UK. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media.
- Herbario Nacional de México (MEXU). (2018). Plantas vasculares en el Portal de datos abiertos UNAM (e línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. www.ib.unam.mx/botanica/herbario/
- Hiriart, M. & Aguilar-Bryan L. 2008. Channel regulation of glucose sensing in the β -cell. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295: E1298-E1306.
- Kaul, K., Tarr, J. M., Ahmad, S.I., Kohner, E.M. & Chibber, R. 2012. Introduction of Diabetes mellitus. En S. I. Ahmad (Ed.). *Diabetes: An Old disease, a New Insight*. (pp 1-10). Nottingham, UK. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media.



- Khan, A.H. & Pessin J.e. 2002. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 45: 1475-1483.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51: 216-226.
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys. D., et al. 1998. Experimental NIDDM: development of new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 47: 224-229.
- Naturalista: <https://www.naturalista.mx>
- Nuissier Gladys. Diaba F. Grignon M. 2008. Bioactive agents from beach waste: *Syringodium flotsam* evaluation as a new source of L-chiro-inositol. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9: 396–400.
- Olivares J.A., Reyes, A & Arellano Plancarte. 2008. Bases Moleculares de las Acciones de la Insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. REB; (1): 9-18.
- Organización Mundial de la Salud. www.who.int/es. Consultada en el 2018
- Rosas-Guzmán, J., Lyr, R & Calvalcant, N. 2009. Diabetes mellitus: visión latinoamericana. Intersistemas. México. 765pp.
- Ruiz de Azua, I., Gautam, D., Guettier, J.-M. & Wess, J. 2011. Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. *Trends Endocrinology Metab*. 22(2): 74-80.
- Segura, J. & Ruilope, L.M. 2013. Contribución del riñón en la homeostasis de la glucosa. *Medicina clínica*. 141 Suppl. 2): 26-30.
- Szkudelski Tomasz. 2012. Streptozotocin–nicotidamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine*. 1-10.
- Soumaya, K. 2012. Molecular Mechanisms of insulin resistance in Diabetes. En S. I. Ahmad (Ed.). *Diabetes: An Old disease, a New Insight*. (pp 240-251). Nottingham, UK. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media.
- Tébar-Massó, F.J. & Escobar-Jiménez, F. 2009. La diabetes en la práctica clínica. *Medica panamericana*. Argentina. 520pp.
- Yap, Angeline. Nishiumi, Shin. Yoshida, Ken-ichi. Ashida, Hitoshi. (2007). Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Springer Science +Business Media*. 55:103-108.