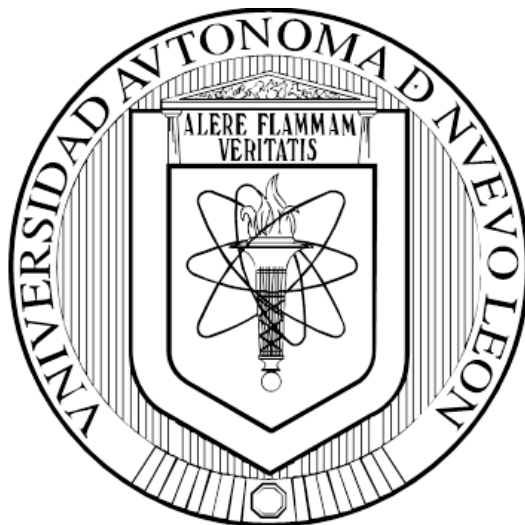


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCÉMICA
Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS**

POR

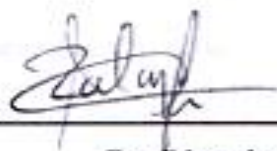
SARA JANNETT ADAME MIRANDA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
QUÍMICA BIOMÉDICA**

AGOSTO, 2018

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCEMICA Y
CITOTOXICA EN EXTRACTOS DE PLANTAS**

Aprobación de la Tesis



Dr. Ricardo Salazar Aranda
Director de Tesis



Dr. Juan José Acevedo Fernández
Co-Director de Tesis



Dra. Noemí Waksman Minsky
Miembro de Tesis



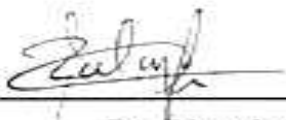
Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Postgrado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCEMICA Y CITOTOXICA EN EXTRACTOS DE PLANTAS

Presentado por

Q.C.B. SARA JANNETT ADAME MIRANDA

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Morelos, bajo la Dirección del Dr. Ricardo Salazar Aranda, la Co-Dirección del Dr. Juan José Acevedo Fernández y como Miembro de la comisión la Dra. Noemí Waksman Minsky.



Dr. Ricardo Salazar Aranda
Director de Tesis



Dr. Juan José Acevedo Fernández
Co-Director de Tesis



Dra. Noemí Waksman Minsky
Miembro de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martinez
Subdirector de Estudios de Postgrado

DEDICATORIA

A mi angelito, Alondra.

A la vulnerabilidad, que hace olvidar de todo lo que se es capaz.

AGRADECIMIENTOS

Es extraño estar escribiendo esta parte. Aunque desde pequeña tuve el sueño de ser química e imaginaba llegar a un nivel de posgrado, conforme uno crece va dejando de soñar tanto.

Tengo tantas personas y cosas que mencionar en esta sección, pero, me daré la libertad de agradecer primero a LA VIDA, perfectamente imperfecta, tan sabia, la que me ha enseñado que los sueños no se cumplen tan rápido, que hay que perseguirlos y mantenerse a paso firme aunque ese sueño se vea inalcanzable.

Mis guías académicos: Dr Ricardo, gracias por confiar en mi y permitirme conocer diferentes maneras de trabajar, por hacerme retar incluso a mi misma y apoyarme en otra etapa mas de mi vida, Dr Juan José, gracias por enseñarme áreas que me habían gustado pero no estaba segura que tanto, por respetar mi ideología y mi filosofía, mostrarme que cuando se quiere se puede y por permitirme ser yo y Dra Noemí. Gracias por permitirme entrar al departamento, aprender, contribuir y llevarme lo mejor de el.

A mis maestros de la maestría que estuvieron para aclárame dudas y guiarme (Dra Vero Rivas, Dra. Rocío Álvarez, Dra. Tannya Ibarra, Dr. Alex Pérez, Dra. Maria de la Luz, Dra. Norma, Dra. Graciela Granados, Dra. Blanca Alánis, Al Dr. Jonathan Pérez y Dr. David Silva por facilitarme los extractos y apoyarme en los ensayos) y al personal de Química Analítica.

Gracias a los diferentes proyectos que me permitieron desarrollar este trabajo: Proyecto CONACyT CB-2013-220882, Red metabólica de Plantas de PRODEP DSA/103-5/16/2258, Red Temática de Farmoquímicos de CONACyT 280002 (2017) y 294727 (2018), Proyecto de Paicyt CE660-18 y la Beca Nacional CONACyT para posgrado bajo el número de becario 711247.

En este trayecto de mi vida se mantuvieron, encontré y me re-encontré con personas realmente maravillosas, personas increíblemente adecuadas:

Mi familia, mis joyas mas preciosas. Mi mayor motivación (Hace dos años escribí mi primera tesis y es sorprendente como la familia ha crecido).

A mis padres, gracias por todo lo que siempre han querido transmitirme, por motivarme a seguir mis ideales, aun si estos son diferentes a los de los demás. Por respetar mi persona y apoyarme aun cuando no pude estar en casa, por entender que mi camino no es fácil y ayudarme a recorrerlo.

Mi hermana, la persona mas hermosa, mas real, mas sencilla, la que siempre me escuchó, me aconsejó, me hizo entrar en razón y me dejó equivocarme a mi manera. Cada logro o nivel desbloqueado es por ti y para ti.

Mi hermano, hombrecito terco, testarudo y loco. Estoy orgullosa de ti y de todo lo que has logrado, jamás cambiaría a mi hermano mayor.

Mi cuñada, la mujer mas fuerte que he conocido. Eres fuerza y tenacidad.

Mi sobrino, el mini Adame, sonriente, llorón y comelón... no veo la hora en que pueda compartir contigo lo poco que sé de la vida, el universo y otras cosas.

Mi abuela, la rebelde que esta de acuerdo en cada aventura. Mis primos, mis tías, mis tíos.

Los 4 monitos. Marley, la causa de todo por lo que se lucha. Lucky, mi coach, mi princesa. Pinto y Fénix, milagritos hermosos.

Mis amigos, nunca he sabido como uno cataloga a una persona como amigo, pero con el tiempo me he dado cuenta que hay personas con las que quieres estar, pasar tiempo, reír, compartir detalles y que cuando algo sale mal, te acompañen por unos chilaquiles, unos pancakes, un chocolate o una cerveza. No hay mejores... cada persona que mencionaré fue de alguna manera una parte fundamental para mi en esta etapa de mi vida.

Mis quaquacitos: Dinora, Roberto y Víctor. Lo siento, no quiero ser cursi, pero ustedes, compañeros de tristezas, frustraciones y muchas emociones tienen que estar aquí plasmados... gracias por cada espectro, cada parámetro y cada todo. Sin ustedes definitivamente, esta etapa hubiera sido más difícil. Alex y Vale, ustedes mis dos chicos con los que no tengo nada en común y a la vez tengo todo, no tengo palabras para describir, simplemente soy taaan feliz de haberlos encontrado.

Juan (bebechin), gracias por sacarme a bailar y siempre estar para esa guamita banquetera que cura todos los males (del corazón, de la tesis, de la vida), gracias por el apoyo siempre brindado.

Mis compañeros de viaje: Selene y Erwin. Gracias por acompañarme y apoyarme aun cuando esto los llevará hasta donde las quesadillas no llevan queso y el clima siempre es primavera, por demostrarme que su locura encaja perfecto con la mía y que no importa donde me encuentre, ustedes sabrán encontrarme.

Naim: Baby, llegaste de repente un día y te quedaste para siempre. Gracias por estar al pendiente, pese a la distancia. Gracias por ser y estar.

Sam y Alex, se que durante estos dos años hemos estado algo distanciados, pero quiero decirles que gracias a ustedes me sostuve en momentos difíciles y pude tomar grandes decisiones, son parte importante de este logro mas.

Mis brazitos: Isa y Gen. Las que no me bajan de ñoñis pero igual siempre me entienden, las que no se enojan si no puedo contestar un mensaje o no puedo un cierto día, porque saben que siempre estaré allí.

Manzanita (Marthita). No se que hice bien para tener una amiga que ha soportado de todo conmigo desde la secundaria, definitivamente no te cambiaría por nada.

Los del cubí: Perli, Omar, Yaz, Mitzi, Aída. Gracias chicos, porque todos estamos en algún momento mal pero hey, las risas no faltaron. Cada almuerzo y comida. AH! Y Omar, gracias por tu conocimiento cromatográfico, no se que habría sido sin el.

Mis amigos de generación, mi cuadro chico. Yolanda, Rebeca, Guille, Rocío, Karen, Cuerna, Xico, Marcos, Erick, Jared, Luis Ángel, Jaudiel, Ángel, David, los quiero!

Olga, gracias por aguantarme un poco mas de un mes como roomie, compartir momentos y mucha mucha comida.

Eli, gracias porque desde que llegue por primera vez a Cuernavaca me apoyaste a adaptarme. Claro, también tengo que agradecer todo el apoyo con la parte experimental, cada cerveza, cada aventura, cada todo.

Mayra, gracias por escucharme, aconsejarme y motivarme a lo que ahora son de los recuerdos mas bonitos que tengo.

Vicky, mi asesina serial favorita je, gracias por siempre estar para apoyarme con los experimentos y lo sentimental también.

Miguel y Pau, gracias por adoptarme, llevarme o darme comida, definitivamente no hubiera sobrevivido, menos esos días pesados en el laboratorio. Yo se que no te equivocaste Mate, gracias!

Angie, Quique, Paty, Pich, chicos mil gracias por alojarme, invitarme y hacer mi estancia tan bonita. Por la comida, las platicas y todo el apoyo, incluso desde lejos. ¡Gracias a todos!

Familia Jaimés Juárez, gracias por cuidarme, llevarme a conocer lugares bonitos y permitirme ser parte de ellos.

Edward, no pensé que alguien pudiera hacerme sentir tan feliz. Llegaste e hiciste mis días mejores. Siempre me recordaste lo capaz que soy y no me dejaste caer, me sostuviste en las buenas y en las malas. Gracias por traer tanta magia a este saco de átomos que ya no se sorprendía con nada. Ahora nunca dejare de creer.

“Gracias a todas las ratas utilizadas en esta tesis (62†)”

"Mira profundamente en la naturaleza y entonces comprenderás todo mejor."

-Albert Einstein

"Gratitud hacia el animal que la humanidad ha utilizado para estudiar la genética, los mecanismos moleculares y físicos de las enfermedades, así como para el desarrollo de nuevos fármacos"

-Nikolai Kolchanov

RESUMEN

Q.C.B Sara Jannett Adame Miranda
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha: Agosto de 2018

Título de estudio: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCÉMICA Y CITOTÓXICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS

Número de páginas: 79

**Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Química Biomédica**

Área de estudio: Química Biomédica

Propósito y Método de Estudio:

La hiperglucemia crónica es un incremento de glucosa debido a un desorden metabólico relacionado con el metabolismo de los carbohidratos, la cual puede llevar a complicaciones macro y micro vasculares. La hiperglucemia postprandial es un factor importante que contribuye al desarrollo de las complicaciones. Una manera de controlar los valores de glucemia es disminuir la digestión y/o absorción de glucosa, ya sea inhibiendo enzimas digestivas y/o transportadores de glucosa. En un trabajo previo se correlacionó la actividad antihiperoglucémica *in vivo* con la inhibición de enzimas digestivas *in vitro*. Sin embargo, algunos extractos sin actividad inhibitoria enzimática presentaron actividad *in vivo*. Este hallazgo, sugirió que para estos extractos podría estar involucrado el mecanismo de absorción de la glucosa en la actividad *in vivo*. En este trabajo se evaluaron 23 extractos de plantas con y sin actividad inhibitoria enzimática. Se determinó su actividad citotóxica a través del método de reducción de MTT con células Vero, utilizando doxorubicina como control positivo y el crecimiento sin inhibidor como control negativo. Se evaluó la inhibición de absorción intestinal de glucosa *in vitro* a través del modelo de saco invertido de rata, utilizando fragmentos de duodeno y yeyuno de ratas Wistar machos. Como control negativo se determinó la absorción de glucosa en ausencia de inhibidores y como control positivo se utilizó el inhibidor empaglifozina. Además, se evaluó la actividad antihiperoglucémica *in vivo* con el ensayo de tolerancia oral al almidón. Se utilizaron ratas Wistar, machos, con ayuno de alrededor de 8 horas. La administración de almidón sin inhibidor fue el control negativo y se utilizó acarbosa como control positivo. Con los resultados obtenidos se realizaron pruebas t student para comparar la actividad de los extractos con los controles negativos, considerando un valor de $p < 0.05$ y un valor de alfa de 0.05, para así demostrar su actividad antihiperoglucémica.

Conclusiones y contribuciones:

14 extractos presentaron actividad antihiperoglucémica y no mostraron actividad citotóxica. A 8 de ellos se les atribuye dicha actividad por la inhibición de enzimas digestivas y de la absorción intestinal de glucosa, mientras que en 6 extractos se sugiere un mecanismo de acción que involucra la inhibición de la absorción intestinal de glucosa.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Carbohidratos.....	1
1.2 Digestión de carbohidratos.....	3
1.3 Absorción de carbohidratos	4
1.4 Alteraciones glucémicas	5
1.4.1 Diabetes mellitus	5
1.4.2 Prediabetes.....	7
1.4.3 Hiperglucemia	7
1.4.3.1 Postprandial	8
1.4.3.2 Por estrés	8
1.4.3.3 Diagnóstico	9
1.4.3.4 Factores de riesgo	10
1.4.3.5 Complicaciones	10
1.4.4 Epidemiología	12
1.5 Tratamiento	13
1.6 Inhibición de Digestión y absorción de carbohidratos	14
1.6.1 Identificación de productos con potencial acción inhibitoria de digestión y absorción de carbohidratos ...	15
1.7 Antecedentes Directos	16
2. Justificación	19
3. Objetivo General	20
4. Objetivos Específicos	21

5. Material y métodos	
5.1 Reactivos	22
5.2 Material Biológico.....	23
5.3 Material general.....	23
5.4 Equipos	
5.5 Evaluación de actividad citotóxica	
5.5.1 Mantenimiento de células activas	24
5.5.2 Ensayo MTT	25
5.6 Evaluación de actividad antihiper glucemiante: Test de Tolerancia Oral al Almidón (TTOA)	26
5.7 Evaluación de absorción intestinal de glucosa: Ensayo de saco intestinal invertido	27
6. Resultados	
6.1 Evaluación de actividad citotóxica	30
6.2 Evaluación de actividad antihiper glucemiante	33
6.3 Evaluación de absorción intestinal del glucosa	41
7. Discusión	51
8. Conclusiones	60
9. Perspectivas	61
Referencias Bibliográficas	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Recomendación de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), 2018	13
II. Resultados de evaluación de actividad antihiper glucémica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de 30 extractos (Granados, 2018)	17
III. Porcentaje de Inhibición de crecimiento celular con adición de Doxorubicina	31
IV. Concentración Citotóxica media de extractos de plantas y control positivo	32
V. Valores de glucemia normalizados a dosis de 0.5 mg/kg	34
VI. Valores de glucemia normalizados a dosis de 2.5 mg/kg	35
VII. Valores de glucemia normalizados a dosis de 5 mg/kg.....	36
VIII. Porcentaje de absorción intestinal de glucosa de extractos a concentración de 5 mg/dL	42
IX. Porcentaje de absorción intestinal de glucosa de extractos a concentración de 10 mg/dL	42
X. Porcentaje de absorción intestinal de glucosa de extractos a concentración de 20 mg/dL	43

LISTA DE FIGURAS

	Figura	Página
1.	Intervalo lineal de crecimiento celular de Doxorubicina	31
2.	Cinéticas de control hiperglucémico y control antihiperglucémico (TTOA)	36
3.	Porcentaje de incremento a los 15 minutos de extractos en dosis de 0.5 mg/kg	38
4.	Porcentaje de incremento a los 15 minutos de extractos en dosis de 2.5 mg/kg	39
5.	Porcentaje de incremento a los 15 minutos de extractos en dosis de 5 mg/kg	40
6.	Cinética de control positivo y control negativo del modelo de saco invertido	41
7.	Porcentaje de absorción de extractos a los 60 minutos a 5 mg/dL.....	45
8.	Porcentaje de absorción de extractos a los 120 minutos a 5mg/dL.....	46
9.	Porcentaje de absorción de extractos a los 60 minutos a 10 mg/dL	47
10.	Porcentaje de absorción de extractos a los 120 minutos a 10 mg/dL	48
11.	Porcentaje de absorción de extractos a los 60 minutos a 20 mg/dL.....	49
12.	Porcentaje de absorción de extractos a los 120 minutos a 20 mg/dL	50

ABREVIATURAS

ATG	Alteración de Tolerancia a la Glucosa
AAD	Asociación Americana de Diabetes
β	Beta
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
CC₅₀	Concentración Citotóxica media
dL	Decilitro
DMEM	DulBecco modified eagle medium
FID	Federación Internacional de Diabetes
GAA	Glucemia Alterada en Ayunas
g	gramo(s)
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
h	hora(s)
IG	Indice Glucémico
Kg	Kilogramo
μg	microgramo
μL	microlítro
mg	miligramo
min	minuto(s)
nm	nanometros
OMS	Organización Mundial de la Salud
K⁺	Potasio
rpm	Revoluciones por minuto
Na⁺	Sodio
TTOA	Test de tolerancia oral al almidón
GLUT	Transportador de glucosa
SGLT	Transportador de glucosa ligado a sodio
v.o.	Vía oral

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El organismo necesita macronutrientes para llevar a cabo gran parte de los procesos químicos que realizan las células. Generalmente, en esta categoría se incluyen el agua, los carbohidratos, las grasas y las proteínas (FAO, 2002).

1.1 Carbohidratos

En particular, los carbohidratos son necesarios para generar energía. Estos son la principal fuente y constituyen la mayor reserva de energía del cuerpo. Son componentes esenciales de todos los organismos y constituyen la clase más abundante de moléculas biológicas (FAO, 2002). La palabra Carbohidrato significa “hidrato de carbono”, es una molécula carbonílica polihidroxilada. Su composición o fórmula química es $C_n(H_2O)_m$ donde n y $m \geq 3$. Los carbohidratos proporcionan al menos el 50% de la ingesta total de calorías en un adulto (Elia, 2007).

Los carbohidratos se pueden clasificar en cuatro grupos: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos son las unidades básicas de los carbohidratos. Los oligosacáridos presentan algunas unidades de monosacáridos ligadas de forma covalente, mientras que, los polisacáridos presentan muchas unidades de monosacáridos ligadas de forma covalente (Cummings, 2007). Los polisacáridos, como el almidón en las plantas y el glucógeno en los animales, sirven como reservorios nutricionales importantes (Ganong, 2002). En el glucógeno, las moléculas de la glucosa se presentan en cadenas largas (moléculas de glucosa unidas por enlaces α -1:4), pero existen algunas cadenas ramificadas (uniones α -1:6). El almidón, independientemente de sus orígenes, contiene principalmente dos tipos diferentes de polímeros de amilopectina y amilosa; unidos por enlaces (1,4) en segmentos lineales y con enlaces (1,6) en puntos de ramificación (Dona, 2006); se deposita en el citoplasma de las células vegetales como gránulos insolubles compuestos del 15% por α -amilosa y 85% de amilopectina. La α -amilosa es un polímero lineal de varios miles de residuos de glucosa unidos por enlaces α -1:4. La amilopectina presenta en mayor medida enlaces α -1:4, pero es una molécula ramificada con puntos de ramificación α -1:6 cada 24 a 30 residuos de glucosa en promedio (Englyst, 2007).

La glucosa es fundamental en los procesos de utilización y/o reserva de energía, distribuida a todos los tejidos, ya que todas las células la utilizan como sustrato energético (glucólisis). Las neuronas son dependientes de glucosa como prácticamente único sustrato energético. Cuando la cantidad de glucosa excede de las necesidades celulares, es almacenada en el hígado, en el músculo bajo la forma de glucógeno y como lípido en los

adipocitos. La glucosa plasmática se obtiene mayormente después de la absorción de los glúcidos ingeridos y digeridos. Sin embargo, también hay procesos interdigestivos de donde proviene la glucosa. En su depósito hepático, el glucógeno será rápidamente hidrolizado a glucosa-6-fosfato y posteriormente a glucosa. Además, puede haber formación de glucosa a partir de otros sustratos no glucídicos, mediante la gluconeogénesis, que tiene lugar a partir de aminoácidos y de lactato, y en menor medida de glicerol (Pérez, 2002).

1.2 Digestión de Carbohidratos

La digestión de los carbohidratos en los animales comienza en la boca con el contacto de los carbohidratos con la enzima α -amilasa salival; la cual hidroliza los enlaces glucosídicos α -1:4 de la amilosa y la amilopectina. Su acción es inhibida cuando la materia alimenticia pasa al estómago. Dentro del estómago se produce hidrólisis ácida, pero no logra una hidrólisis completa.

El bolo alimenticio seguirá su tránsito, hasta llegar a la primera porción del intestino delgado. En el intestino delgado, la α -amilasa pancreática actúa sobre los polisacáridos ingeridos, interviniendo bajo la misma acción de la enzima salival. El borde del cepillo intestinal contiene además α -glucosidasas. Estas enzimas son proteínas transmembranales cuya función es hidrolizar los enlaces α -1:6 glucosídicos. El resultado final de la digestión son monosacáridos listos para la absorción al interior de la célula. La mayor parte de los monosacáridos se absorben en el duodeno y el yeyuno (Ferrier, 2014).

1.3 Absorción de Carbohidratos

Las moléculas que participan en los mecanismos de transporte implicados en la absorción de la glucosa desde la luz intestinal, se encuentran en el borde en cepillo de la célula epitelial. La glucosa es absorbida por las células de la mucosa un proceso de transporte que depende de la presencia de iones sodio (Na^+). La glucosa y el Na^+ se unen a un Co-transportador (SGLT-1, por sus siglas en inglés *sodium-glucose linked transporter*) que efectúa la translocación de ambos sustratos (glucosa y Na^+) a través de la membrana. La unión de Na^+ al transportador promueve un cambio conformacional que aumenta su afinidad por la glucosa. El Na^+ transportado al interior del enterocito se separa del transportador y es expulsado por la bomba Na^+/K^+ ATPasa a través de la membrana basolateral, lo que recupera el gradiente electroquímico intracelular para este ion. Se han identificado tres Co-transportadores SGLT (SGLT-1, SGLT-2 y SGLT-3) y todos tienen una estructura similar. En particular, el SGLT-1 transporta dos moléculas de sodio por una de glucosa, se expresa mayoritariamente en intestino delgado y puede encontrarse en algunos segmentos de la nefrona proximal (Ganong, 2002).

La glucosa absorbida en el enterocito es transportada a la circulación sanguínea mediante un proceso de difusión facilitada, en presencia de un transportador de glucosa (GLUT2, por sus siglas en inglés *Glucose transporter 2*), que no consume energía. Se han identificado trece tipos de GLUT. Cada una de sus isoformas tiene ubicación y características cinéticas propias, adaptadas a las necesidades metabólicas de los diferentes tejidos. En particular, GLUT-2 se encuentra localizado en el intestino delgado, en algunos segmentos de la nefrona proximal y en células beta de páncreas; sus principales funciones

son el transporte de glucosa en las células intestinales, en la reabsorción renal de glucosa y como sensor de glucosa del páncreas, respectivamente (Ferrier, 2014).

Por otro lado, la insulina se produce en las células beta (β) de los islotes de Langerhans, localizados en el páncreas. La liberación de insulina es un proceso indispensable en la homeostasis del cuerpo como respuesta al aporte energético del consumo de alimentos. A través de la vena porta, llega al hígado donde alrededor de un 50% se retiene y es degradada allí. El resto se distribuye en las células de otros órganos y tejidos, acoplándose a su receptor específico. El receptor insulínico se encuentra en la membrana citoplasmática (Jacome, 2005). Una vez unida la insulina al receptor, los transportadores de glucosa (GLUT) acarrear y transportan moléculas de glucosa al interior de las células (Carvalho et al, 2002). Posteriormente, las células utilizan la glucosa en distintas vías metabólicas, regulando así el valor sanguíneo (Ganong, 2002).

1.4 Alteraciones glucémicas

Los niveles de glucosa en sangre son estrictamente controlados por diferentes estímulos y mecanismos. Sin embargo, diferentes alteraciones hipo e hiperglucémicas. Los valores de glucosa en sangre normales se encuentran entre 70 – 100 mg/dL.

1.4.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus pertenece a un grupo de enfermedades metabólicas crónicas causada por el deterioro en la producción y/o actividad de la insulina. Tales anomalías llevan a la hiperglucemia crónica, que a su vez altera el metabolismo de los carbohidratos (Yussof, 2015). La glucemia se eleva a valores anormales (>126 mg/dL) hasta alcanzar

concentraciones nocivas (>200 mg/dL) para los sistemas fisiológicos, provocando daño en distintos tejidos. Existen tres tipos principales de diabetes mellitus: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2 y diabetes mellitus gestacional (IDF, 2017).

La diabetes mellitus tipo 1 es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema inmunológico ataca a las células beta del páncreas. Como resultado, el organismo produce poca o nula insulina, provocando una deficiencia de dicha hormona. Las causas de este proceso destructivo no se entienden completamente, pero se sabe que los implicados son una combinación de susceptibilidad genética y factores medioambientales, como infecciones virales, toxinas o algunos factores dietéticos. Generalmente, este tipo de diabetes se presenta en la infancia o adolescencia, pero puede presentarse en cualquier edad. Se presentan síntomas significativos como: sed excesiva, frecuente micción, cansancio extremo, hambre constante, pérdida de peso, visión borrosa, etc (IDF, 2017).

Por otro lado, la diabetes tipo 2 se caracteriza por la producción de insulina insuficiente o una respuesta inadecuada del organismo a los efectos de la insulina, lo que provoca una acumulación de glucosa sanguínea. Se relaciona directamente con factores de riesgo modificables como: obesidad, sobrepeso, inactividad física y dietas con alto contenido calórico y bajo valor nutricional. Este tipo de diabetes se ve con más frecuencia en adultos mayores, pero aparece en niños, adolescentes y jóvenes debido al aumento de los niveles de obesidad, a la falta de actividad física y a las deficiencias de la dieta.

La diabetes gestacional se presenta en etapas avanzadas del embarazo. La madre desarrolla resistencia a la insulina, la cual se bloquea por las hormonas producidas en la

placenta provocando insensibilidad a la insulina. Normalmente este tipo de diabetes desaparece después del nacimiento. Sin embargo, se ha reportado mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 tanto en la madre como en el hijo (IDF, 2017).

1.4.2 Prediabetes

Se utilizó el término “Pre-diabetes” cuando los niveles de glucosa en sangre se encuentran altos, pero no alcanzan los valores para ser diagnosticada como diabetes (>126 mg/dL). No presentan síntomas, por lo que pueden transcurrir años antes de hacer un diagnóstico (IDF, 2017). Se dice que se presenta una tolerancia anormal a la glucosa (TAG), definida como altos niveles de glucosa en sangre después de comer; mientras que la alteración de glucosa en ayunas (AGA) se define como altos valores de glucosa en sangre después de un período de ayuno. Aunque no todas las personas con estos padecimientos desarrollan diabetes, tienen mayor riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares u otras complicaciones (OMS, 2017; NIH, 2013).

1.4.3 Hiperglucemia

Se considera hiperglucemia cuando el nivel de glucosa en sangre se encuentran por encima de 126 mg/dL en estado de ayuno, superior a 140 mg/dL después de dos horas de la ingesta de alimentos o mayor de 200 mg/dL a cualquier hora del día (OMS, 2017).

Existen distintas manifestaciones clínicas que causan hiperglucemia, como: manejo inadecuado de la diabetes tipo 1 o tipo 2, mayor ingesta de alimentos, menos actividad física a la programada, exposición a situación de estrés, etc. Cuando los niveles de glucosa en sangre se mantienen elevados causan diferentes síntomas, como: náuseas, vómito,

cansancio, somnolencia, sed excesiva, frecuencia al orinar, pérdida de peso, dolor abdominal, hambre, irritabilidad, visión borrosa, entre otros (NIH, 2013).

El alto nivel de glucemia aparece cuando el organismo no cuenta con la suficiente cantidad de insulina o su efecto no es el necesario. La hiperglucemia también se presenta si el organismo no puede utilizar la insulina adecuadamente (NIH, 2013).

1.4.3.1. Hiperglucemia postprandial

La glucemia postprandial se presenta generalmente 10 minutos después de una comida. La magnitud y duración del pico hiperglucémico es conocido como índice glucémico (IG). El índice glucémico depende de una variedad de factores, como el horario, cantidad y composición de la comida. Entre mayor sea el IG de un alimento en una persona, más rápido elevará la glucosa. En personas normoglucémicas, el nivel de glucosa normalmente se mantiene menor a los 140 mg/dL durante los 60 minutos después de la ingesta de alimento y vuelven en 2 o 3 horas a valores basales (<126 mg/dL). En personas con diabetes tipo 1 o 2, el IG dependerá además de la administración de la insulina (en caso de utilizarla en su tratamiento) (AMD, 2016).

1.4.3.2. Hiperglucemia por estrés

Es la consecuencia de una serie de alteraciones hormonales caracterizada por el incremento de las hormonas contra-reguladoras de la insulina (glucagon, cortisol, catecolaminas y hormona del crecimiento) y por la respuesta inflamatoria sistémica. Estos cambios son responsables del incremento de la glucogénesis, glucogenólisis hepática y de la resistencia periférica a la acción de la insulina que caracterizan el metabolismo

glucídico durante el estrés (Coller, 2008). Se caracteriza por la existencia de hiperglucemia, hiperinsulinemia con resistencia periférica a la acción de la insulina e hiperproducción de glucosa. El grado de la hiperglucemia por estrés guarda una correlación positiva con la gravedad de la respuesta inflamatoria sistémica, ya que es secundaria a una respuesta neuroendócrina con hipersecreción de las hormonas contra-reguladoras de insulina y a la liberación de citocinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral alfa y las interleucinas 1 y 6 (Manzanares, 2010).

1.4.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la hiperglucemia es realizado a través de diferentes síntomas (cansancio, sed anormal y boca seca, micción frecuente, fatiga, apetito constante, visión borrosa, etc) y exámenes clínicos para evaluar los niveles de la glucosa en sangre. De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (2017), se recomienda evaluar la glucemia en ayunas, prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTG), glucemia en cualquier hora del día y/o hemoglobina glucosilada (HbA1c). El examen de glucosa en sangre requiere un ayuno de alrededor de 8 horas. No se diagnostica alteración hasta que se realice al menos en dos ocasiones aisladas o bien, se obtenga un valor >126 mg/dL (OPS, 2012).

La prueba de tolerancia a la glucosa o PTG, consiste en tomar una muestra sanguínea en ayunas y después ingerir una cantidad controlada de glucosa (generalmente 75 g), para tomar otra muestra dos horas después. Los valores de la glucosa en ayunas deben ser <100 mg/dL. Un resultado entre 100 – 126 mg/dL puede corresponder a pre-diabetes. Mientras

que un resultado ≥ 126 mg/dL es diagnóstico de diabetes. En cuanto a los resultados después de las dos horas de la ingesta de glucosa, los valores deben ser < 140 mg/dL. Mientras que, valores ≥ 200 mg/dL corresponden a diabetes (IDF, 2017). Una medición de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dL indica la presencia de diabetes. Además, la HbA1c es una medición de control de promedio de la glucosa que tuvo contacto con los glóbulos rojos durante los tres meses anteriores. El cálculo de la hemoglobina glucosilada es un indicador del control del paciente con diabetes. De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (AAD), los niveles de HbA1c $\geq 6.5\%$ se consideran diagnóstico de diabetes; los valores entre $5.7 - 6.4\%$ son diagnóstico de pre-diabetes y los resultados del examen menores que 5.6% son normales.

1.4.4.4 Factores de riesgo

Existen distintos factores de riesgo y/o predisposición en el desarrollo de hiperglucemia que pueden desencadenar alguna alteración glucémica. Hay factores modificables, los cuales pudieran formar parte de la prevención y/o tratamiento como: el sobrepeso, el sedentarismo, la hipertensión, el colesterol elevado, hábito de fumar y mala alimentación. Entre los factores no modificables se encuentra la predisposición genética, la edad, origen étnico, otras enfermedades u otros tratamientos (Federación Internacional de Diabetes, 2017).

1.4.4.5 Complicaciones

Los constantes niveles altos de glucosa en sangre pueden causar distintos daños micro vasculares (lesiones de los vasos sanguíneos pequeños) y macro vasculares (lesiones de

vasos sanguíneos más grandes). Las complicaciones micro vasculares pueden inducir lesiones oculares, como la retinopatía que pueden terminar en ceguera, lesiones renales (nefropatía) que pueden llegar a insuficiencia renal o alteraciones microcirculatorias en miembros inferiores que pueden inducir úlceras crónicas. Las complicaciones macro vasculares pueden generar enfermedades cardiovasculares, como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares (Mathers, 2006).

El aumento prolongado de glucemia también puede causar dos afecciones metabólicas graves: la cetoacidosis diabética y el síndrome hiperosmolar diabético. La cetoacidosis diabética (llamada así por ser más presentada en pacientes diabéticos), se desarrolla por la falta de insulina dificultando el ingreso de glucosa a las células, por lo que el organismo debe obtener la energía por otras vías, como la oxidación de lípidos. Este proceso produce cetonas que se acumulan en la sangre y se excretan por la orina. Por otro lado, el síndrome hiperosmolar diabético es menos común que la cetoacidosis y su diferencia es la magnitud de la deshidratación, la cetosis y la acidosis. Dicho síndrome se debe a un déficit de insulina y a un exceso de glucagón, por lo que se impide la entrada de glucosa a las células, acumulándose en el plasma. Por ello, el organismo intenta aumentar la síntesis de glucosa. La liberación de glucagón se desencadena por la baja cantidad de insulina, y la glucosa que se produce en el hígado es vertida hacia la circulación. El glucagón estimula el metabolismo de grasas y proteínas en un intento de proporcionar energía a las células. La glucosa excesiva, junto con los productos de desecho del metabolismo incompleto de las grasas y las proteínas, se acumulan en el torrente sanguíneo y con ello se produce un aumento en la hiperosmolaridad (Villanueva, 2003). En la cetacidosis diabética y el

síndrome hiperosmolar, el exceso de glucosa se excretará a través de la orina (Alamilla, 2015).

1.4.4. Epidemiología

La hiperglucemia no es monitoreada a través de los sistemas de salud, por lo que no puede controlarse de manera temprana. En ocasiones es asintomática y comúnmente detectada hasta que se presenta alguna de las enfermedades donde la hiperglucemia es la característica principal. En el año 2017, la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés *International Diabetes Federation*), reportó que 425 millones de personas padecen diabetes en el mundo. No obstante, se calcula que en todo el mundo hasta 212.4 millones de personas, no son conscientes de estar enfermos. Si dichas tendencias continúan, para el año 2045, 693 millones de personas entre 18 a 99 años, o 629 millones de personas de 20 a 79 años, tendrán diabetes. Además, se calcula que hay 352.1 millones de personas en todo el mundo tienen alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG). Para el año 2045, se prevé que el número de personas de 20 a 79 años con ATG aumente a 587 (entre 384.4 y 992.7) millones, o el 8.3% (del 5.6 al 13.9%) de la población adulta. IDF reportó que, aproximadamente, 4.0 millones de personas de entre 20 y 79 años murieron de diabetes en 2017, lo que equivale a un fallecimiento cada ocho segundos. La diabetes ha sido responsable del 10.7% de la mortalidad mundial por cualquier causa en personas de este grupo de edad. Por otro lado, IDF y OMS consideran que entre el 20-25% de la población adulta mundial padece síndrome metabólico, lo que duplica e incluso triplica el riesgo de morir de una cardiopatía o enfermedad vascular cerebral comparada con la población sana.

1.4.5 Tratamiento de las alteraciones glucémicas (hiperglucemia)

Para el control de la hiperglucemia se parte de una modificación de hábitos, en donde la dieta y la actividad física juegan un papel muy importante. Sin embargo, en la mayoría de los casos se recurre al uso de tratamiento farmacológico para tratar la hiperglucemia (en la diabetes, principalmente).

En la TABLA I se enlistan las opciones terapéuticas actuales recomendadas por la AAD (2018) para el control de la glucemia.

TABLA I. Recomendación para control de la glucemia (AAD, 2018).

	Mecanismo de acción	Ejemplos
Análogos de insulina	Actúan sobre las células como la insulina humana, pero se absorben desde el tejido graso de forma más predecible.	De acción rápida: <ul style="list-style-type: none"> • Aspart • Glulisina • Lyspro De acción prolongada: <ul style="list-style-type: none"> • Detemir • Gargina
Secretagogos de Insulina	Estimulan producción y secreción de insulina en páncreas.	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfonilureas • Meglitinidas
Sensibilizadores de Insulina	Mejoran la respuesta periférica de la insulina.	<ul style="list-style-type: none"> • Biguanidas • Tiazolinedionas • Glitazonas
Inhibidores de digestión y absorción de carbohidratos	Limitan la absorción a nivel intestinal de monosacáridos.	Inhibidores de α -glucosidasa: <ul style="list-style-type: none"> • Acarbosa

	Disminución en la reabsorción a nivel renal.	<ul style="list-style-type: none"> • Miglitol
		Inhibidores de GLUTs: <ul style="list-style-type: none"> • Canagliflozina • Dapagliflozina • Empagliflozina

1.5 Inhibidores de digestión y absorción de Carbohidratos

La acción de los inhibidores de enzimas digestivas radica en limitar la digestión de carbohidratos complejos. Se reduce la producción de monosacáridos libres, por lo que, su principal efecto es la reducción del pico hiperglucémico. El efecto es un retraso en la absorción de monosacáridos (principalmente glucosa) provenientes de la digestión. Los principales efectos secundarios se producen a nivel gastrointestinal (dolor abdominal y diarrea) (Bolen et al, 2007).

Por otro lado, la acción de los inhibidores de SGLT-1 y 2, disminuyen la absorción de monosacáridos desde el epitelio intestinal al torrente sanguíneo y la reabsorción de glucosa en la luz del túbulo contorneado proximal renal. De esta manera se reduce la concentración sérica de glucosa. Esto es de interés farmacológico porque el bloqueo de estos transportadores, pudiera atenuar la absorción gastrointestinal de glucosa y ofrece una manera de reducir la hiperglucemia postprandial e incluso inducir la pérdida de peso (Chao, 2010).

1.5.1 Identificación de productos con potencial acción inhibitoria de digestión y absorción de carbohidratos

La identificación de productos con actividad biológica requiere la realización de bioensayos ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los ensayos *in vitro* evalúan un solo mecanismo de acción bajo un ambiente que trata de asemejar las condiciones fisiológicas, mientras que, en los ensayos *in vivo* se evalúa el efecto dentro de un organismo (Eli Lilly, 2016). En los modelos *in vivo* se utilizan distintos animales, aunque el más común es el murino. Existen técnicas empleadas para el estudio de la función digestiva y de absorción de los carbohidratos. En la prueba de tolerancia oral al almidón (TTOA), se toma el valor basal de glucemia del animal y se administra una dosis de almidón en base a su peso. Posteriormente, se miden los valores de glucemia en intervalos de tiempo con el fin de obtener un perfil cinético que simule el efecto que tiene la ingesta de carbohidratos complejos diarios (Cobelli et al, 2014). La prueba de tolerancia al almidón evalúa dos vías fisiológicas: la digestión de carbohidratos complejos en monosacáridos absorbibles por enzimas digestivas; y la absorción intestinal de esos monosacáridos a través de transportadores de glucosa intestinal (Dona, 2019).

Dentro de los modelos *in vitro* se han desarrollado diferentes sistemas para evaluar la absorción intestinal. Existen métodos fisicoquímicos con membranas artificiales, líneas celulares, tejidos extraídos, enterocitos aislados, entre otros. La técnica del saco invertido utiliza intestinos *ex vivo* para estudiar el transporte de sustancias a través de la pared intestinal. El método consiste en revertir un segmento intestinal dejando al exterior la mucosa intestinal. Se toman mediciones de los valores de glucosa contenida en el interior

del saco en un intervalo de tiempo. Se obtiene un perfil cinético con la finalidad de simular la absorción intestinal de glucosa (Wilson & Wiseman, 1954).

Por otro lado, la evaluación de toxicidad forma parte de la bioevaluación de compuestos y/o extractos. Existen diferentes métodos para evaluar la actividad citotóxica. En particular, el método de MTT (sal de tetrazolio) es un ensayo de viabilidad celular, en el cual se monitorea la actividad metabólica de las células al reducir las sales de tetrazolio por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales (Mosmann, 1983).

1.6 Antecedentes Directos

Granados (2017), en su Tesis Doctoral evaluó 30 extractos a través del ensayo de inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa, ambos *in vitro* con el fin de aplicar ensayos, previamente optimizados y validados. La actividad antihiper glucémica de 9 extractos con actividad inhibitoria sobre una o ambas enzimas y 5 no activos, fue evaluada en un modelo *in vivo*, utilizando almidón de maíz como fuente de carbohidratos. Los 9 extractos activos *in vitro* mostraron actividad *in vivo* al menos en una dosis, mientras que de los extractos que no presentaron actividad inhibitoria enzimática *in vitro*, 3 resultaron activos *in vivo* en al menos una dosis (ver TABLA II).

Estos hallazgos sugirieron que el efecto antihiper glucemiante que presentaron los extractos que no inhiben las enzimas digestivas, puede ser debido a un mecanismo relacionado con la absorción de carbohidratos o de monosacáridos.

TABLA II. Resultados de evaluación de actividad Antihiper glucémica *in vitro e in vivo* de 30 extractos (Granados, 2017).

Muestra	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>		
	alfa-glucosidasa	alfa-amilasa	Dosis (mg/kg)		
	CI ₅₀ (ug/mL)	CI ₅₀ (ug/mL)	0.5	2.5	5
Residuo acuoso de <i>Ceanothus caeruleus</i>	17.7 ± 1.67	13.97 ± 0.91	Activo	NA	Activo
Extracto butanólico de <i>Juglans mollis</i>	27.9 ± 0.21	12.29 ± 0.53	NA	NA	Activo
Extracto metanólico de <i>Juglans mollis</i>	33.2 ± 0.31	>50	NA	Activo	Activo
Extracto de acetato de etilo de <i>Juglans mollis</i>	53.3 ± 4.83	>50	NA	NA	Activo
Extracto acuoso de <i>Juglans mollis</i>	74.5 ± 0.58	8.75 ± 0.22	NA	Activo	NA
Extracto metanólico de <i>Uncaria tomentosa</i>	107.9 ± 2.01	4.75 ± 0.04	NA	NA	Activo
Extracto de acetato de etilo <i>Jatropha dioica</i>	141.9 ± 6.37	>50	NE	NE	NE
Extracto metanólico de <i>Piqueria trinervia</i>	>330	9.09 ± 0.06	NA	Activo	Activo
Extracto hidroalcohólico de <i>Jatropha dioica</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto metanólico (crudo) de <i>Juglan smollis</i>	>330	>50	NA	NE	NE
Extracto butanólico de <i>Hamelia patens</i>	>330	6.33 ± 0.81	NA	NA	Activo
Extracto metanólico de <i>Hamelia patens</i>	>330	3.74 ± 0.19	NA	NA	Activo
Extracto crudo de <i>Hamelia patens</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto metanólico 70% <i>Hamelia patens</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto hexánico de <i>Juglans mollis</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto crudo de <i>Persea americana</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto de acetato de etilo de <i>Hamelia patens</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto metanólico 100% <i>Hamelia patens</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto hexánico de <i>Hamelia patens</i>	>330	>50	NE	NE	NE
Extracto metanol:agua (90:10) de <i>Salvia texana</i>	>660	>50	NA	NA	NA
Extracto metanol: agua (90:10) de <i>Salvia beatiflora</i>	>660	>50	NA	NA	Activo
Extracto de cascara y semilla de uva victoria	>660	>50	NA	NA	NA
Extracto de cáscara de uva victoria	>660	>50	NA	NA	NA
Extracto 1	>660	>50	NE	NE	NE
Extracto 2	>660	>50	NE	NE	NE
Extracto 3	>660	>50	NE	NE	NE
Extracto 4	>660	>50	NE	NE	NE
Extracto 5	>660	>50	NE	NE	NE
Extracto de <i>Turnera diffusa</i>	>660	>50	NA	NA	NA

Extracto metanólico de <i>Ricinus communis</i>	>660	>50	NA	NE	NA
Acarbosa	164.31 ± 1.65	2.9 ± 0.03	A	NE	NE

NA: No activo

NE: No evaluado

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

La hiperglucemia puede desencadenar diferentes complicaciones que tienen alta tasa de morbilidad y mortalidad, por lo que representa un problema mayor de salud pública. En los últimos años se han buscado alternativas que ayuden a mantener o controlar los valores de glucemia normales.

Se ha demostrado que algunos productos naturales presentan inhibición de las enzimas digestivas *in vitro*, así como actividad antihiperglucemiante *in vivo*. Por lo que resulta interesante evaluar la absorción de glucosa frente a extractos activos (en uno o ambos ensayos), y su toxicidad celular.

CAPÍTULO 3

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antihiper glucémica y citotóxica de extractos de plantas.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la toxicidad de extractos de plantas a través del método MTT en células Vero.
2. Evaluar la actividad antihiper glucémica *in vivo* de 11 extractos.
3. Evaluar el efecto de los extractos con actividad antihiper glucémica sobre absorción intestinal de glucosa con el ensayo de saco intestinal invertido de rata.

CAPITULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

- Medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), Gibco ®
- Suero fetal bovino, Gibco ®
- Antibióticos y L-glutamina, Gibco ®
- PBS, Gibco ®
- Tripsina, Gibco ®
- Almidón de maíz, SIGMA ®
- Acarbosa $\geq 95\%$, SIGMA ®
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9%, VWR ®
- Cloruro de sodio (NaCl), SIGMA ®
- Dextrosa, SIGMA ®
- MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazólico) , SIGMA ®
- Doxorrubicina, SIGMA ®

- Empaglifoquina, Manchester Organics®

5.2 Material biológico

- Línea celular Vero
- Ratas Wistar

5.3 Material general

- Placas de Poliestireno de 96 pocillos
- Frasco de cultivo T25, T75 y T175
- Pipetas lineales plásticas estériles 5, 10, 25 y 50 mL
- Pipetas automáticas 2 – 20, 10 – 100 y 100 – 1000 μ L
- Puntillas para pipetas automáticas
- Tubos cónicos estériles de 15 y 50 mL
- Cámara de Neubauer
- Eppendorf 250 μ L y 2 mL
- Tubos de precipitado de plástico (4 mL)
- Jeringas estériles 1, 3 y 5 mL
- Tijeras quirúrgicas
- Pinzas quirúrgicas
- Bomba para pecera
- Pipeta pasteur
- Hilo quirúrgico
- Tirillas reactivas de glucómetro ONE TOUCH Ultra (Código 25)

5.4 Equipos

- Lector de placas, Thermo Scientific ® Multiskan FC, Modelo 0.357
- Incubadora, Thermo Scientific ® MIDI 40 CO₂
- Campana de flujo laminar, Prendo ®, CSB 120
- Balanza analítica, Ohaus ®, Pioneer
- Vortex, Thermo Scientific ®, Maxi MIXII
- Glucómetro, ONE TOUCH ® Ultra 2
- Glucómetro, Accu Check ®
- Invertoscopio, Olympus ®, CKX41
- Centrífuga, Thermo IEC ®, Centra CL3R
- Placa de agitación para microplacas, VWR
- Esterilizadora, Market Forge ®, Sterimatic STMEL
- Placa de agitación, Fisherbrand ®, Isotemp Advanced
- Vortex, Fisher Scientific ®, Analog Vortex Mixer
- Baño de agua, Labolan ®, DsK-22

5.5 Evaluación de la actividad citotóxica

5.5.1 Mantenimiento de células activas

Se sembraron células de un pasaje anterior en un frasco de cultivo y se agregó medio (DMEM 10%SFB, 1% L-glutamina y 1% antibióticos), se incubó a 37°C y 5% CO₂. Se realizó traspase de células al alcanzar el 90% de confluencia. Se agregó tripsina para despegar las células del frasco y se incubó durante 5 minutos. Se adicionó medio fresco y se transfirió a un tubo cónico estéril. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Se re-

suspendió el paquete celular en medio de cultivo fresco y una parte se transfirió a un nuevo frasco de cultivo.

5.5.2 Ensayo de MTT

A partir de la suspensión celular (que se mencionó en el apartado anterior), se preparó una dilución para realizar un conteo (40 μL de medio fresco, 10 μL de azul tripano y 10 μL de suspensión celular). Se realizó el conteo en los cuatro cuadrantes de una cámara de Neubauer y se calculó la concentración de células utilizando la siguiente fórmula:

$$C = n * 6 * 10,000$$

donde, C es la concentración de células por mL, n es el promedio de células por cuadrante, 6 es el factor de la suspensión y 10,000 corresponde a la dilución en la cámara.

Se preparó la solución celular a una concentración de 200,000 células/mL. Se añadieron 200 μL de la suspensión celular en cada pozo de la microplaca. Se colocaron 200 μL del control o extractos en los pocillos (con repeticiones de 5 pocillos en 3 placas diferentes). Se evaluaron los extractos en un rango de concentración entre 0.5 – 500 $\mu\text{g/mL}$. El control positivo (Doxorrubicina) se evaluó en un rango de concentración de 0.5 a 8 $\mu\text{g/mL}$. En todos los casos las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 por 48 h. Se revisó el crecimiento para descartar contaminación. Se decantó el contenido de la placa. Se agregó 200 μL de solución de MTT (0.5 mg/mL en solución amortiguadora) a cada pozo. Se incubó durante 3 horas bajo condiciones estándar. Se decantó el contenido de la

placa y se disolvieron los cristales formados con 200 μ L de DMSO. Después de agitar, se midió la absorbancia de cada pozo a 540 nm.

La absorbancia de cada pozo se comparó contra la obtenida con el control negativo (100% viabilidad o 0% inhibición) y se calculó el porcentaje de viabilidad. Los datos de cada placa se manejaron por separado. Se graficaron los porcentajes de inhibición en función a las concentraciones de extracto o doxorubicina y se determinó la concentración citotóxica media (CC_{50}) por interpolación. Se calculó el promedio de CC_{50} de cada muestra, así como su desviación estándar.

5.6 Evaluación de la actividad antihiper glucémica: Ensayo de tolerancia oral al almidón

Los experimentos para determinar la actividad antihiper glucémica *in vivo* se realizaron en el laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Se siguió el mismo protocolo publicado en la tesis doctoral de Granados (2017).

Se utilizaron ratas Wistar, machos, normoglucémicas con un peso aproximado de 220 g y un ayuno de 8 horas. Todos los animales se mantuvieron en el laboratorio con agua y alimento *ad libitum* u fueron tratados bajo la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Se formaron grupos de 5 ratas cada uno:

- Grupo control negativo (Control de hiperglucemia con almidón de maíz): Se administró 1g/kg de peso de almidón de maíz en agua destilada, v. o.
- Grupo control positivo (Control anti hiperglucemiante, acarbosa): Se administró una mezcla de 1g/kg de almidón de maíz adicionado con 0.5 mg/kg de acarbosa en agua destilada, v. o.
- Grupo(s) Prueba (extractos): Se administraron mezclas de 1g/kg de almidón de maíz con dosis de 0.5, 2.5 y 5 mg/kg de extracto en agua destilada.

En todos los casos se retiró el alimento a los animales 8 horas antes de la evaluación. Después del ayuno se midió la glucosa basal en sangre total (extraída de la punta de la cola) con tiras reactivas en un glucómetro portátil (Accu check). Posteriormente, se pesaron los animales. Se administró el almidón en ausencia o presencia de acarbosa o extractos. Se midió la glucosa en sangre total a los 15, 30, 45, 60 y 120 minutos. Los valores de glucemia obtenidos se normalizaron, como sigue: se dividió el valor de glucemia de cada tiempo entre el valor basal del mismo animal; de manera que el valor basal normalizado, siempre fue 1. Se construyeron graficas de cinética de la glucemia normalizada. Se comparó la disminución del pico de cada extracto contra el aumento del control negativo a los 15 minutos a través de pruebas t student para la comparación de dos muestras suponiendo varianzas iguales, considerando un valor de $p < 0.05$ y alfa de 0.05, en el programa Excel.

5.7 Evaluación de la absorción intestinal de glucosa: Ensayo de saco intestinal invertido

Los experimentos para determinar la actividad antihyperglucémica *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación farmacológica, Facultad de

Medicina de la UAEM. Se siguió el protocolo reportado por Nuñez (2018), diseñado y reportado por primera vez por Wiselman (1954).

Se utilizaron ratas Wistar, machos, con un peso aproximado de 400 g. Todos los animales se mantuvieron en el laboratorio con agua y alimento *ad libitum*. Todos los animales fueron tratados bajo la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Se sacrificaron los animales por medio de una dislocación cervical. Se realizó una incisión abdominal y se extrajo el intestino delgado. A partir del duodeno y la primera parte del yeyuno, se aislaron trozos de intestino de alrededor de 5 cm de largo. Cada trozo se lavó con solución salina y se ligó con hilo quirúrgico de un extremo. Con ayuda de una varilla de vidrio (sellada de extremo con papel parafilm) se desplazó hacia el lado contrario a la ligadura. Una vez invertido, se ligó el otro extremo a una pipeta pasteur y se llenó el saco intestinal con solución fisiológica (NaCl 0.15M y pH 7.4). Se verificó que no presentara fuga (manteniendo alrededor de 10 a 15 segundos en el aire, observando que la solución salina no saliera del saco).

Posteriormente, se incubó en solución salina con o sin adición de empaglifozina (5 mg/dL) o extracto (5, 10 y 20 mg/dL), a 37°C con burbujeo constante durante 3 horas. A través de la pipeta se tomaron alícuotas (aproximadamente 1 gota) de la parte interior del saco a los 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos. Se midió el valor de glucosa en un glucómetro (ONE TOUCH).

Se graficó el aumento de la concentración de glucosa en el interior del saco en función del tiempo de incubación. Se calculó el porcentaje de absorción en los diferentes tiempos respecto al control negativo. Se realizó una comparación estadística del porcentaje de absorción de cada extracto contra el porcentaje de absorción del control negativo a los 60 y 120 minutos a través de pruebas t student para la comparación de dos muestras suponiendo varianzas iguales, considerando un valor de $p < 0.05$ y alfa de 0.05, en el programa Excel.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Evaluación de la actividad citotóxica de extractos a través del método

MTT

Se utilizaron células Vero con alrededor del 90% de confluencia. En los ensayos de viabilidad del control sin tratamiento (negativo), los valores de absorbancia siempre estuvieron entre 0.580 – 0.650 unidades.

6.1.1 Determinación de la Concentración Citotóxica media (CC₅₀) de Doxorrubicina

Se evaluaron 6 concentraciones: 60, 24, 3.84, 1.54 y 0.614 µg/mL. Los porcentajes de inhibición obtenidos con doxorrubicina se enlistan en la tabla III. Se graficó el porcentaje de inhibición de crecimiento de las células en función de la concentración de doxorrubicina para obtener la curva de crecimiento (ver FIGURA 1) y determinar su Concentración Citotóxica media (CC₅₀) (ver FIGURA 2).

TABLA III. Porcentajes de inhibición de crecimiento de células Vero en presencia de Doxorubicina.

Doxorrubicina $\mu\text{g/mL}$	% Inhibición de crecimiento		
	1	2	3
60	82.39 ± 1.29	84.56 ± 0.87	85.12 ± 2.21
24	76.05 ± 0.45	74.58 ± 1.15	74.31 ± 1.01
9.6	48.23 ± 0.75	46.22 ± 0.24	47.69 ± 0.88
3.84	31.64 ± 2.13	27.23 ± 1.17	30.04 ± 0.56
1.54	25.75 ± 3.12	20.67 ± 2.87	27.89 ± 3.91
0.614	17.73 ± 2.56	15.59 ± 4.53	13.45 ± 3.82

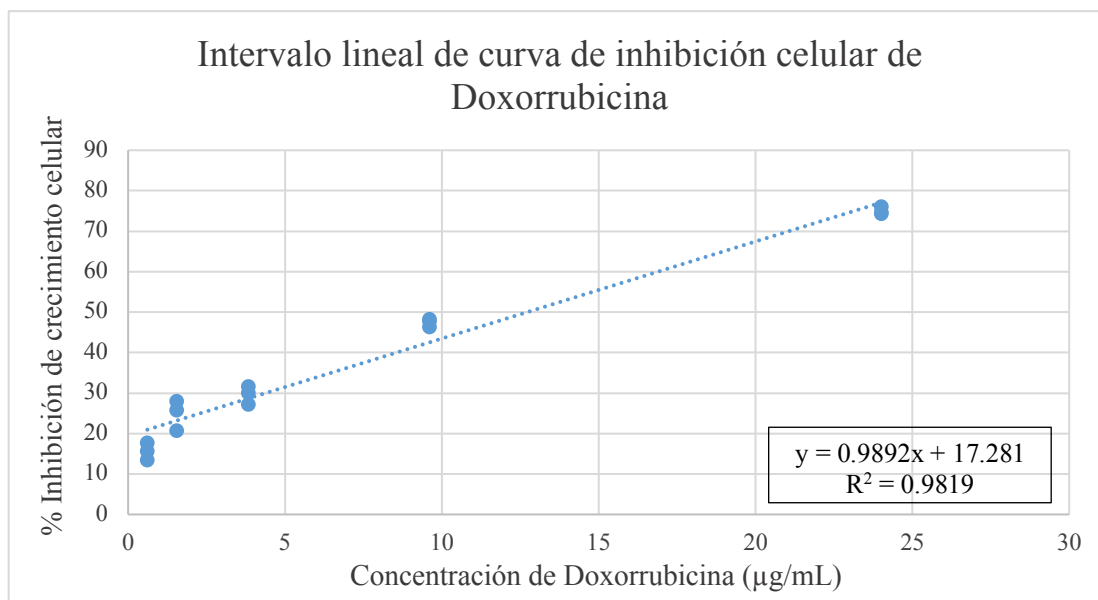


FIGURA 1. Intervalo lineal de inhibición de crecimiento celular (Utilizando: Método MTT, línea celular Vero, 540 nm).

6.1. 2 Determinación de CC₅₀ de extractos

De los 23 extractos evaluados, 21 no mostraron inhibición del crecimiento celular a la máxima concentración evaluada (500 µg/mL). Mientras que el extracto metanólico de *Juglans mollis* y el extracto de acetato de etilo de *Jatropha dioica* mostraron un valor de CC₅₀ de 285.72 ± 9.1 y 256.97 ± 24.85 µg/mL, respectivamente (Ver TABLA IV).

TABLA IV. Concentración Citotóxica media (CC₅₀) de extractos y control positivo.

Clave	Extracto	CC ₅₀ (µg/mL)
S1	Acuoso de <i>Ceanothus caeruleus</i>	>500
S2	Butanólico de <i>Juglans mollis</i>	>500
S3	Metanólico de <i>Juglans mollis</i>	285.72 ± 9.1
S4	Acetato de etilo de <i>Juglans mollis</i>	>500
S5	Acuoso de <i>Juglans mollis</i>	>500
S6	Metanólico de <i>Uncaria tomentosa</i>	>500
S7	Metanólico de <i>Chysatinia Mexicana</i>	>500
S8	Butanólico de <i>Hamelia patens</i>	>500
S9	Metanólico de <i>Hamelia patens</i>	>500
S10	Hidroalcoholico de <i>Salvia texana</i>	>500
S11	Hidroalcoholico de <i>Salvia beateflora</i>	>500
S12	Metanólico de <i>Turnera diffusa</i>	>500
S13	Acetato de etilo <i>Jatropha dioica</i>	256.97 ± 24.85
S14	Hidroalcohólico de <i>Jatropha dioica</i>	>500
S15	Hidroalcoholico de <i>Juglans mollis</i>	>500
S16	Metanólico (Crudo) de <i>Hamelia patens</i>	>500
S17	Hidroalcoholico (50%) de <i>Hamelia Patens</i>	>500
S18	Hexánico de de <i>Juglans mollis</i>	>500

S19	Metanólico de de <i>Persea americana</i>	>500
S20	Acetato de etilo de de <i>Hamelia patens</i>	>500
S21	Hidroalcoholico (70%) de <i>Hamelia patens</i>	>500
S22	Hexánico de de <i>Hamelia patens</i>	>500
S23	Metanólico de <i>Ricinus communis</i>	>500
	Doxorrubicina	12.83 ± 0.53

6.2 Evaluación de la actividad antihiper glucémica *in vivo*

Se evaluaron 11 extractos a través del Ensayo de tolerancia oral al almidón. Se realizó para un grupo control con hiperglucemia, un grupo control con acarbosa como antihiper glicémico y 33 grupos de prueba que incluyeron 11 extractos a 3 dosis (0.5, 2.5 y 5 mg/kg).

Los valores de glucemia normalizados obtenidos de todos los grupos en una dosis de 0.5 mg/kg se enlistan en la TABLA V, en una dosis de 2.5 mg/kg en la TABLA VI y en una dosis de 5 mg/kg en la TABLA VII.

La actividad antihiper glucémica *in vivo* fue significativa ($p < 0.5$) respecto al control negativo para algunos extractos: en la dosis de 0.5 mg/kg, hubo diferencia significativa en los extractos S9, S18 y S23; en la dosis de 2.5 mg/kg, los extractos significativos fueron S3, S9, S13, S17, S19, S20, S21, S22 y S23; mientras que en la dosis de 5 mg/kg, los extractos significativos fueron S9 y S19.

TABLA V. Valores de glucemia normalizada a dosis de 0.5 mg/kg.

T	Alm	Aca	S3	S9	S13	S14	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
0'	1.00 ± 0.0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
15'	1.37 ± 0.04	1.15 ± 0.02	1.30 ± 0.11	1.16 ± 0.07	1.27 ± 0.08	1.24 ± 0.09	1.30 ± 0.05	1.10 ± 0.06	1.33 ± 0.06	1.26 ± 0.09	1.42 ± 0.04	1.32 ± 0.02	1.17 ± 0.06
30'	1.38 ± 0.07	1.11 ± 0.06	1.34 ± 0.08	1.16 ± 0.06	1.42 ± 0.07	1.49 ± 0.08	1.44 ± 0.05	1.44 ± 0.08	1.51 ± 0.09	1.52 ± 0.08	1.51 ± 0.08	1.59 ± 0.08	1.32 ± 0.09
45'	1.22 ± 0.06	1.14 ± 0.06	1.26 ± 0.16	1.15 ± 0.07	1.31 ± 0.08	1.49 ± 0.11	1.31 ± 0.06	1.50 ± 0.10	1.54 ± 0.11	1.48 ± 0.11	1.51 ± 0.14	1.68 ± 0.10	1.34 ± 0.13
60'	1.20 ± 0.06	1.18 ± 0.03	1.27 ± 0.08	1.21 ± 0.02	1.34 ± 0.09	1.58 ± 0.12	1.24 ± 0.13	1.51 ± 0.12	1.48 ± 0.07	1.24 ± 0.07	1.51 ± 0.14	1.52 ± 0.03	1.3 ± 0.09
120'	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.05	1.18 ± 0.07	1.05 ± 0.07	1.13 ± 0.08	1.16 ± 0.08	1.23 ± 0.12	1.15 ± 0.12	1.27 ± 0.09	1.22 ± 0.12	1.24 ± 0.13	1.19 ± 0.05	1.25 ± 0.19

T = Tiempo

Alm = Almidón

Aca = Acarbosa

TABLA VI. Valores de glucemia normalizada a dosis de 2.5 mg/kg.

T	Alm	Aca	S3	S9	S13	S14	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
0'	1.00 ± 0.0 0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
15'	1.37 ± 0.04	1.15 ± 0.02	1.22 ± 0.09	1.22 ± 0.07	1.14 ± 0.05	1.32 ± 0.03	1.12 ± 0.09	1.33 ± 0.06	1.21 ± 0.03	1.14 ± 0.09	1.06 ± 0.08	1.20 ± 0.09	1.09 ± 0.05
30'	1.38 ± 0.07	1.11 ± 0.06	1.24 ± 0.06	1.29 ± 0.12	1.16 ± 0.07	1.31 ± 0.06	1.21 ± 0.05	1.22 ± 0.07	1.22 ± 0.03	1.30 ± 0.10	1.12 ± 0.08	1.23 ± 0.06	1.16 ± 0.06
45'	1.22 ± 0.06	1.14 ± 0.06	1.07 ± 0.04	1.29 ± 0.14	1.16 ± 0.05	1.24 ± 0.08	1.15 ± 0.06	1.20 ± 0.08	1.19 ± 0.05	1.15 ± 0.08	1.04 ± 0.04	1.13 ± 0.04	1.08 ± 0.08
60'	1.20 ± 0.06	1.18 ± 0.03	1.09 ± 0.06	1.16 ± 0.10	1.07 ± 0.06	1.14 ± 0.06	1.10 ± 0.05	1.08 ± 0.07	1.16 ± 0.04	1.14 ± 0.08	1.04 ± 0.07	1.11 ± 0.04	1.04 ± 0.07
120'	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.05	1.06 ± 0.08	1.07 ± 0.09	1.03 ± 0.08	1.02 ± 0.05	1.06 ± 0.08	0.99 ± 0.07	1.07 ± 0.05	1.04 ± 0.09	0.96 ± 0.05	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08

T = Tiempo

Alm = Almidón

Aca = Acarbosa

TABLA VII. Valores de glucemia normalizada a dosis de 5 mg/kg

T	Alm	Aca	S3	S9	S13	S14	S17	S18	S19	S20	S21	S22	S23
0'	1.00 ± 0.0 0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
15'	1.37 ± 0.04	1.15 ± 0.02	1.31 ± 0.07	1.15 ± 0.04	1.31 ± 0.09	1.36 ± 0.06	1.35 ± 0.05	1.33 ± 0.10	1.21 ± 0.05	1.55 ± 0.08	1.49 ± 0.06	1.43 ± 0.09	1.35 ± 0.09
30'	1.38 ± 0.07	1.11 ± 0.06	1.40 ± 0.07	1.31 ± 0.07	1.42 ± 0.10	1.34 ± 0.07	1.26 ± 0.08	1.52 ± 0.05	1.56 ± 0.09	1.28 ± 0.08	1.48 ± 0.08	1.36 ± 0.10	1.48 ± 0.08
45'	1.22 ± 0.06	1.14 ± 0.06	1.28 ± 0.09	1.38 ± 0.08	1.23 ± 0.11	1.39 ± 0.08	1.44 ± 0.08	1.31 ± 0.03	1.36 ± 0.06	1.44 ± 0.10	1.46 ± 0.10	1.50 ± 0.11	1.44 ± 0.05
60'	1.2 ± 0.06	1.18 ± 0.03	1.30 ± 0.02	1.34 ± 0.01	1.34 ± 0.08	1.38 ± 0.04	1.38 ± 0.08	1.22 ± 0.07	1.58 ± 0.10	1.30 ± 0.07	1.49 ± 0.08	1.54 ± 0.10	1.54 ± 0.05
120'	1.00 ± 0.08	0.94 ± 0.05	1.13 ± 0.09	1.06 ± 0.05	1.14 ± 0.10	1.14 ± 0.05	1.14 ± 0.07	1.12 ± 0.09	1.16 ± 0.04	1.20 ± 0.02	1.19 ± 0.05	1.24 ± 0.05	1.17 ± 0.12

T = Tiempo

Alm = Almidón

Aca = Acarbose

En la FIGURA 2 se muestra la cinética de glucemia normalizada de los controles de hiperglucemia (almidón) y antihiperglucemia (almidón + acarbosa). Los valores de glucemia normalizada a los 15 y 30 minutos son estadísticamente diferentes ($p < 0.5$).

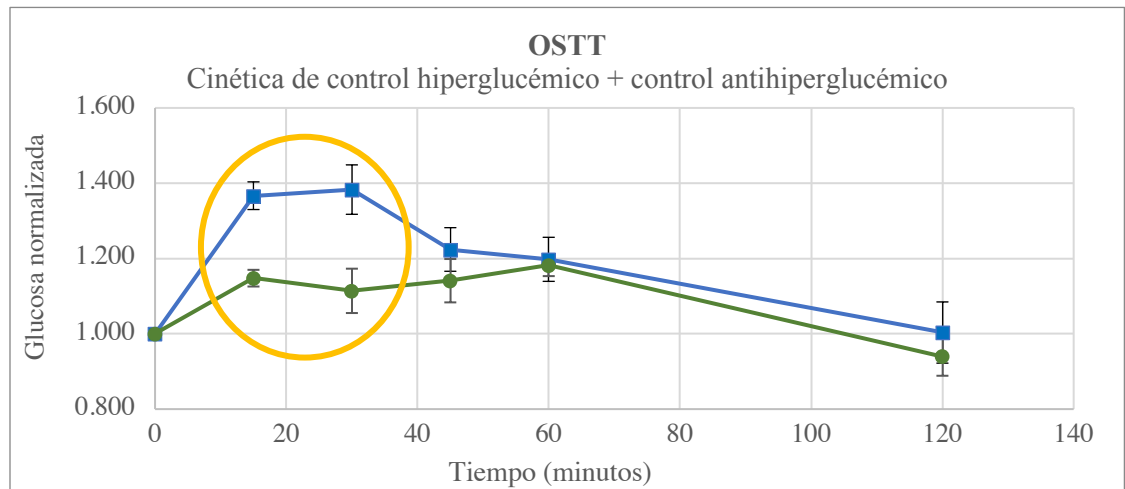


FIGURA 2. Cinéticas de control hiperglucémico y control antihiperglucémico.

Se calcularon los porcentajes de incremento de la glucosa normalizada a los 15 minutos de los extractos evaluados en una dosis de 0.5, 2.5, y 5 mg/kg (FIGURAS 3, 4 y 5). Se compararon con el porcentaje de incrementos del control negativo para determinar aquellos extractos que presentan actividad antihiperglucémica.

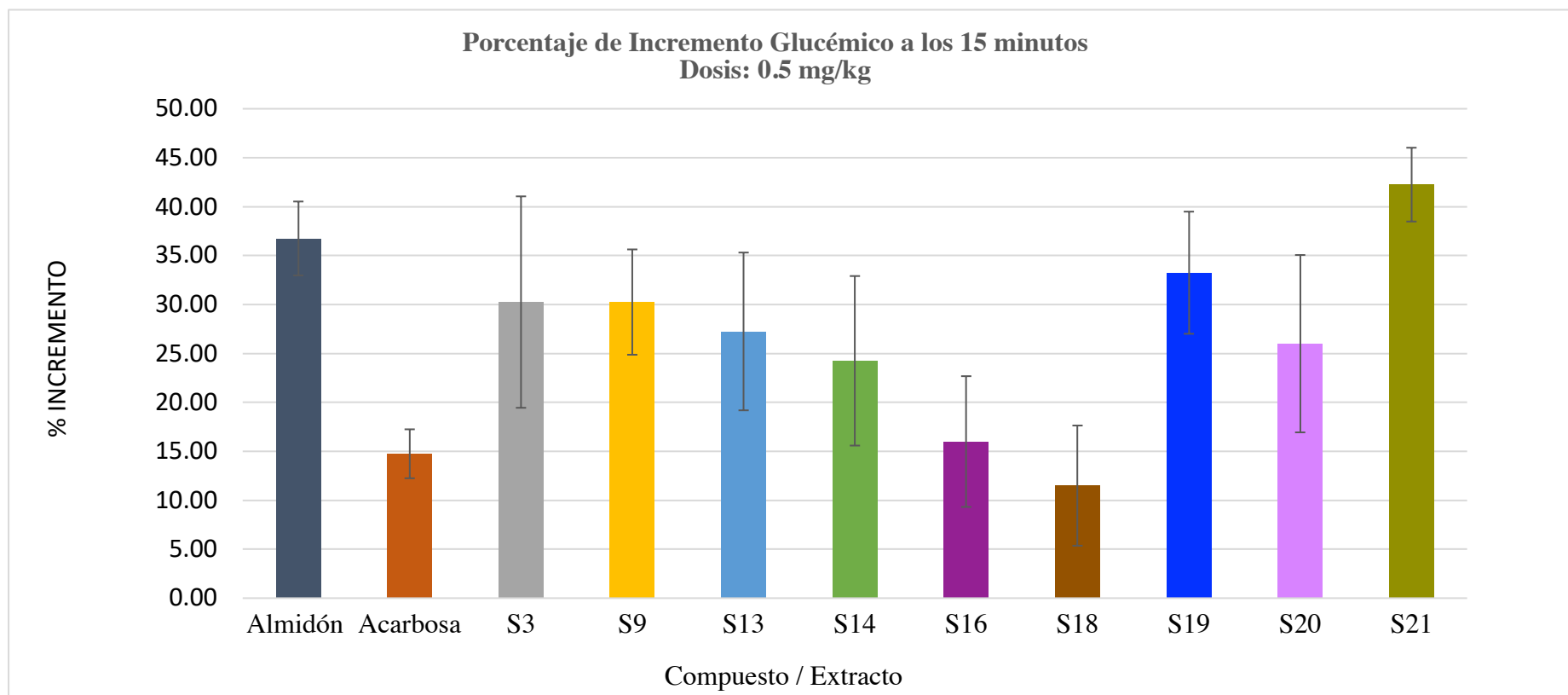


FIGURA 3. Porcentaje de incremento a los 15 minutos de extractos en dosis de 0.5 mg/kg.

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

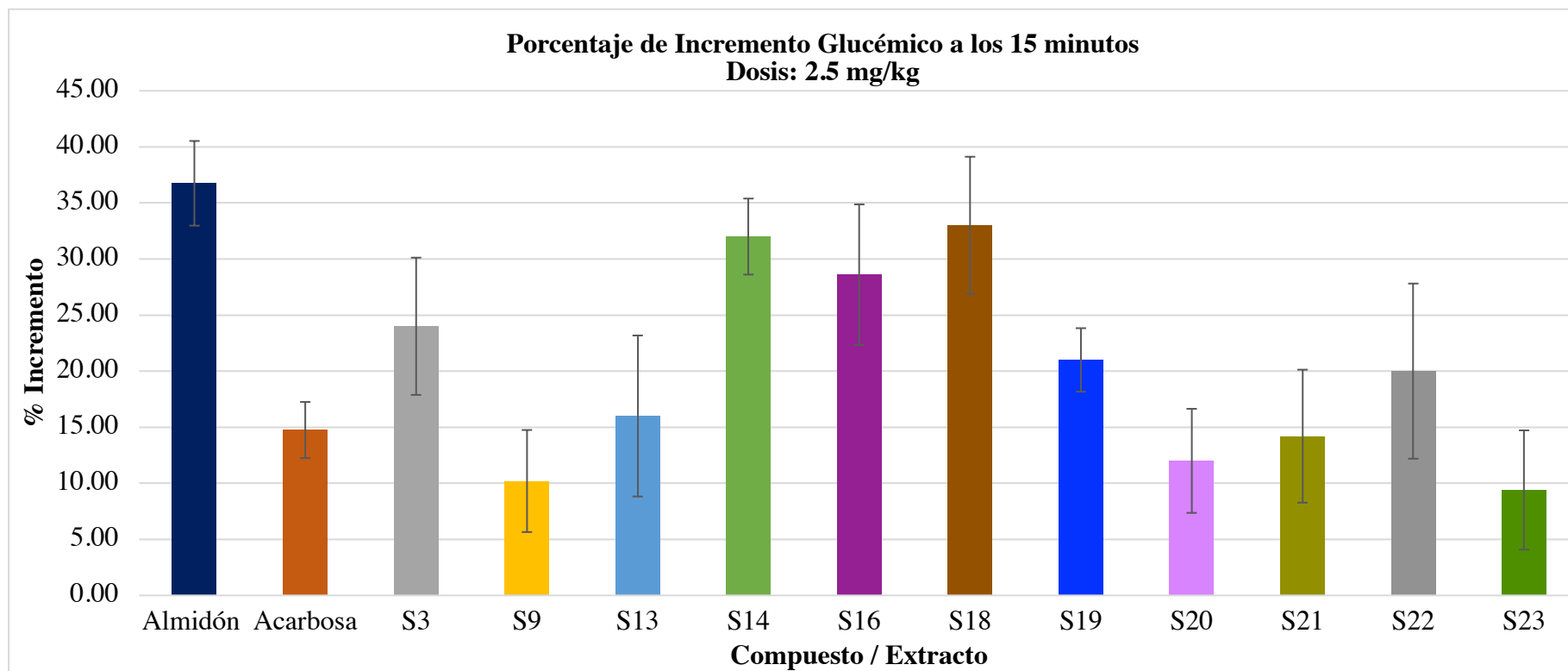


FIGURA 4. Porcentaje de incremento a los 15 minutos de extractos en dosis de 2.5 mg/kg.

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

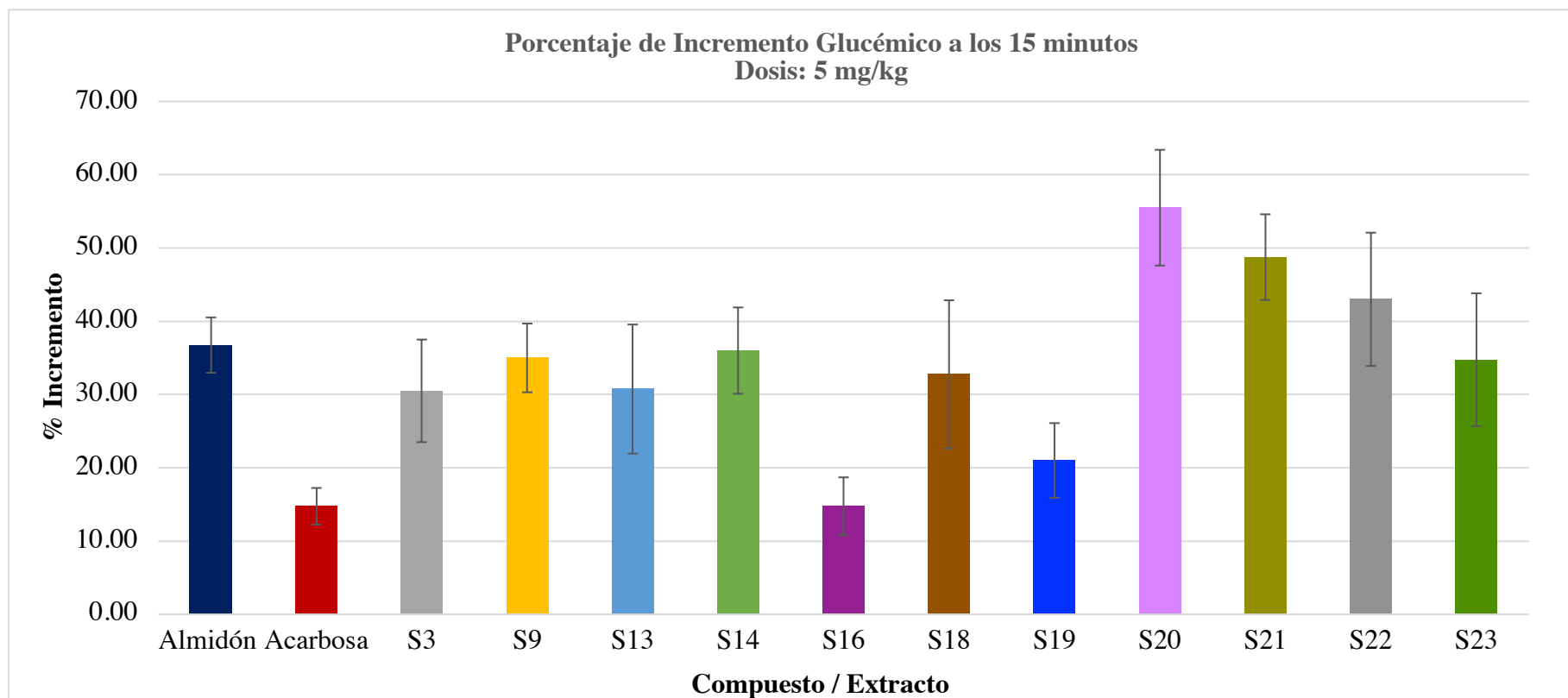


FIGURA 5. Porcentaje de incremento a los 15 minutos de extractos en dosis de 5 mg/kg.

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

6.3 Evaluación sobre la absorción intestinal de glucosa

En la FIGURA 6 se muestra la cinética de absorción intestinal normal de glucosa comparada con la cinética de la inhibición de SGLT-1 por empaglifozina, las cuales sirvieron para representar el control negativo y el control positivo, respectivamente.

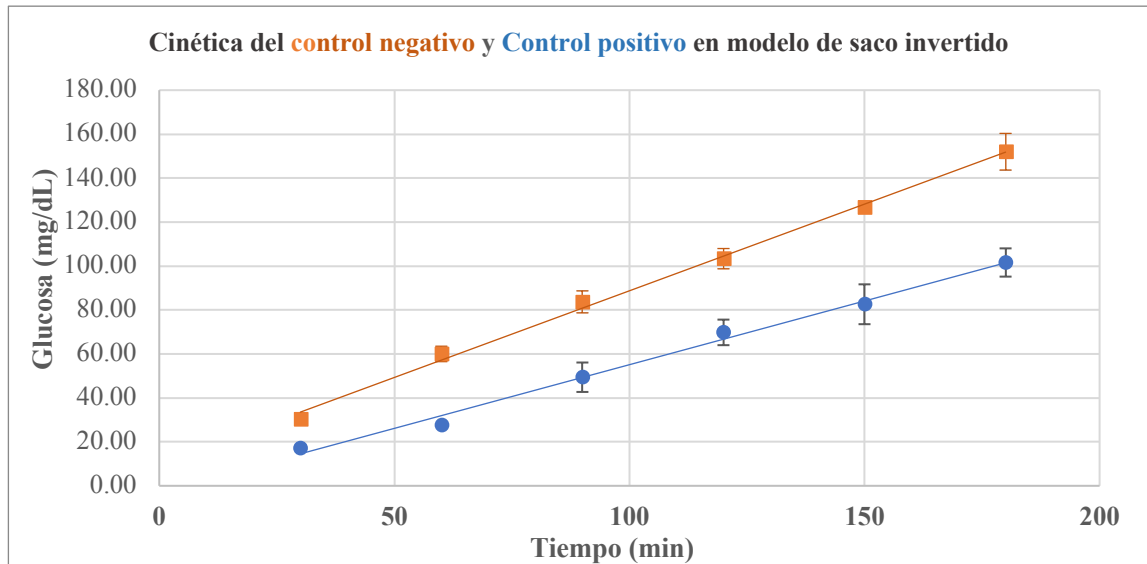


FIGURA 6. Cinética de absorción intestinal de glucosa para el control positivo y el control negativo en el modelo de saco intestinal invertido.

En las TABLAS VIII, IX y X se enlistan los porcentajes de absorción de glucosa a través del saco invertido incubados con los extractos (a concentración 5, 10 y 20 mg/dL, respectivamente).

Tabla VIII. Porcentaje de absorción de extractos a una concentración de 5 mg/dL.

5 mg/dL	% Absorción					
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Control negativo	100 ± 0.00	100 ± 5.00	100 ± 4.62	100 ± 2.52	100 ± 8.33	100 ± 7.94
Control positivo	56.04 ± 0.00	40 ± 6.98	59.04 ± 5.81	67.59 ± 9.07	65.21 ± 6.43	66.84 ± 6.90
S1	85.05 ± 8.35	113.33 ± 6.3	92.75 ± 10.58	87.87 ± 7.36	81.16 ± 13.48	71.97 ± 11.55
S2	126.92 ± 4.43	104.58 ± 3.59	89.04 ± 5.45	79.11 ± 8.26	76.58 ± 5.60	63.16 ± 10.03
S3	113.18 ± 6.92	110 ± 8.98	96.81 ± 8.48	93.06 ± 9.33	84.34 ± 7.94	79.16 ± 5.54
S4	107.96 ± 2.87	57.41 ± 7.09	95.32 ± 4.65	93.14 ± 5.85	87.24 ± 6.35	72.70 ± 6.35
S5	121.15 ± 6.34	98.3 ± 15.12	86.35 ± 5.12	82.26 ± 3.37	79.54 ± 5.73	75.66 ± 5.72
S6	110.44 ± 8.81	68.33 ± 6.29	97.71 ± 2.5	87.58 ± 3.87	75.39 ± 5.06	70.89 ± 8.54
S7	162.36 ± 4.57	116.7 ± 10.45	108.76 ± 5.41	102.09 ± 9.11	92.57 ± 8.30	87.17 ± 2.89
S8	65.93 ± 3.56	81.48 ± 8.5	81.27 ± 7.16	79.60 ± 5.44	75.59 ± 6.29	71.05 ± 7.87
S9	184.61 ± 2.82	108.3 ± 10.78	126.69 ± 0.00	80.13 ± 2.12	76.97 ± 2.12	67.43 ± 4.95
S11	79.12 ± 5.35	88.33 ± 5.56	82.77 ± 9.43	86.61 ± 6.95	86.45 ± 3.00	86.18 ± 8.41
S12	73.35 ± 5.56	113.3 ± 1.83	112.35 ± 6.05	104.03 ± 8.5	101.64 ± 4.57	93.59 ± 5.32
S13	167.31 ± 6.8	104.58 ± 9.03	91.14 ± 4.19	78.63 ± 5.12	67.30 ± 7.14	66.28 ± 4.72
S14	180.49 ± 3.40	158.3 ± 8.21	126.09 ± 9.95	114.68 ± 7.85	99.08 ± 2.38	89.31 ± 3.30
S16	146.70 ± 9.26	175 ± 13.67	103.98 ± 3.36	95.08 ± 5.91	80.92 ± 8.96	69.41 ± 10.60
S17	239.01 ± 10.6	190 ± 23.01	128.78 ± 10.5	109.11 ± 10.9	85.46 ± 8.99	71.38 ± 5.20
S19	145.88 ± 6.99	121.7 ± 10.34	102.49 ± 6.13	107.90 ± 3.87	97.5 ± 5.80	86.02 ± 2.50
S20	92.30 ± 4.24	88.33 ± 5.56	83.36 ± 4.65	72.34 ± 4.79	74.21 ± 1.83	72.37 ± 6.06
S21	65.11 ± 3.77	65.00 ± 9.31	56.77 ± 2.65	67.74 ± 5.16	76.97 ± 7.19	64.31 ± 6.45
S23	228.30 ± 12.45	146.7 ± 6.1	126.09 ± 6.45	109.11 ± 9.98	82.5 ± 7.94	62.17 ± 8.23

Tabla IX. Porcentaje de absorción de extractos a una concentración de 10 mg/dL

10 mg/dL	% Absorción					
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Control negativo	100 ± 3.51	100 ± 5.00	100 ± 4.62	100 ± 2.52	100 ± 8.33	100 ± 7.94
Control positivo	56.04 ± 0.00	46 ± 6.69	59.04 ± 5.81	67.55 ± 9.06	65.21 ± 6.43	66.84 ± 6.80
S1	175.55 ± 3.95	125 ± 2.16	111.16 ± 3.56	97.74 ± 2.45	89.21 ± 2.59	82.40 ± 3.77
S2	126.09 ± 6.14	106.66 ± 4.32	82.47 ± 6.22	83.47 ± 9.07	64.74 ± 9.76	77.80 ± 7.37
S3	98.08 ± 2.22	101.25 ± 6.84	98.90 ± 2.5	94.11 ± 5.90	70.67 ± 5.5	80.10 ± 3.10
S4	116.21 ± 5.91	99.58 ± 7.93	92.33 ± 4.27	93.15 ± 5.85	80.13 ± 3.87	74.34 ± 10.42

S5	130.22 ± 6.56	115 ± 5.83	108.76 ± 2.16	92.42 ± 3.11	87.24 ± 4.20	81.74 ± 3.09
S6	97.25 ± 5.08	94.16 ± 10.08	92.33 ± 5.25	95.56 ± 7.89	82.30 ± 4.86	84.05 ± 4.11
S7	129.39 ± 10.69	112.5 ± 10.40	88.45 ± 9.05	94.35 ± 7.33	93.55 ± 7.85	80.76 ± 4.57
S8	118.68 ± 6.98	115.42 ± 4.79	95.02 ± 2.08	83.71 ± 1.29	76.58 ± 2.94	76.64 ± 5.57
S9	187.09 ± 3.77	130.42 ± 7.14	103.69 ± 3.95	90.73 ± 3.86	82.11 ± 4.16	71.88 ± 5.12
S11	154.12 ± 5.12	95.83 ± 9.33	74.70 ± 6.40	88.31 ± 7.23	80.53 ± 6.38	69.74 ± 7.57
S12	180.49 ± 2.75	126.25 ± 4.99	107.57 ± 7.07	91.94 ± 2.83	87.43 ± 6.55	74.84 ± 3.86
S13	105.49 ± 5.60	99.17 ± 4.65	82.77 ± 5.32	77.90 ± 3.11	67.30 ± 3.5	59.21 ± 2.58
S14	117.86 ± 9.88	85.83 ± 8.35	81.87 ± 7.72	69.68 ± 7.48	68.09 ± 8.26	79.61 ± 7.19
S16	137.64 ± 7.14	124.58 ± 12.2	119.22 ± 7.5	105.73 ± 8.26	98.68 ± 6.27	87.83 ± 10.12
S17	187.09 ± 3.77	130.42 ± 7.14	103.69 ± 3.95	90.73 ± 3.86	82.11 ± 4.16	71.88 ± 5.12
S19	135.16 ± 6.27	115.42 ± 7.09	100.99 ± 3.11	85.40 ± 3.20	79.93 ± 7.27	69.90 ± 6.45
S20	224.18 ± 3.74	128.33 ± 6.22	105.18 ± 8.41	95.56 ± 8.30	85.66 ± 6.19	78.46 ± 9.18
S21	147.53 ± 4.43	76.25 ± 1.71	74.70 ± 4.04	85.40 ± 2.5	86.84 ± 5.48	75.49 ± 3.60
S23	150 ± 4.65	145.42 ± 6.34	136.55 ± 6.40	116.13 ± 6.06	98.49 ± 4.5	88.32 ± 11.87

Tabla X. Porcentaje de absorción de extractos a una concentración de 20 mg/dL

20 mg/dL	% Absorción					
	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Control negativo	100 ± 3.51	100 ± 5.00	100 ± 4.62	100 ± 2.52	100 ± 8.33	100 ± 7.94
Control positivo	100 ± 0.00	100 ± 6.70	100	67.55 ± 9.07	65.21 ± 6.43	66.84 ± 6.80
S1	247.25 ± 5.29	156.25 ± 2.22	132.97 ± 8.18	117.58 ± 8.74	99.08 ± 9.04	86.68 ± 11.32
S2	71.70 ± 3.40	82.08 ± 3.30	87.85 ± 10.15	92.18 ± 6.18	83.29 ± 5.45	74.01 ± 7.23
S3	63.05 ± 3.25	70 ± 2.16	73.80 ± 6.18	79.35 ± 5.72	77.96 ± 7.5	72.86 ± 6.24
S4	177.20 ± 2.22	148.33 ± 5.23	109.06 ± 6.29	99.68 ± 11.66	98.68 ± 5.35	90.13 ± 3.46
S5	65.11 ± 2.60	35.42 ± 3.86	45.42 ± 7.16	65.08 ± 5.62	64.14 ± 1.89	70.07 ± 4.65
S6	155.77 ± 14.1	86.25 ± 7.14	89.04 ± 6.24	68.23 ± 4.80	78.75 ± 8.96	70.23 ± 6.5
S7	56.04 ± 0.00	23.56 ± 8.54	63.65 ± 8.88	99.68 ± 6.88	97.70 ± 10.78	95.23 ± 7.72
S8	247.25 ± 3.56	174.58 ± 10.8	137.75 ± 3.30	121.21 ± 3.10	105.59 ± 4.57	91.78 ± 4.80
S9	131.04 ± 7.50	154.17 ± 9.18	94.13 ± 13.20	82.26 ± 10.23	77.76 ± 6.35	77.47 ± 4.86
S11	77.47 ± 13.00	65.42 ± 15.44	69.92 ± 11.56	76.45 ± 5.89	69.87 ± 5.80	62.33 ± 6.29
S12	87.37 ± 11.24	106.25 ± 11.3	120.12 ± 8.35	112.02 ± 13.9	106.18 ± 6.61	89.47 ± 7.44
S13	170.60 ± 4.92	145.83 ± 13.0	119.82 ± 5.38	109.60 ± 3.77	91.58 ± 4.76	76.15 ± 4.19
S14	74.18 ± 6.81	81.25 ± 9.14	82.47 ± 9.20	91.45 ± 10.63	87.63 ± 8.29	88.49 ± 8.81
S16	66.76 ± 3.28	68.33 ± 4.69	79.78 ± 5.74	52.02 ± 4.86	76.18 ± 12.34	71.23 ± 5.74
S17	56.04 ± 0.00	36.25 ± 5.62	74.40 ± 8.88	103.31 ± 4.27	94.14 ± 4.57	92.59 ± 9.64

S19	63.46 ± 2.87	75 ± 10.65	78.88 ± 7.75	75.48 ± 7.39	75.20 ± 10.90	70.07 ± 6.86
S20	76.65 ± 5.19	163.33 ± 5.32	130.28 ± 6.24	94.11 ± 8.26	92.96 ± 7.68	81.41 ± 5.85
S21	67.03 ± 3.06	98.89 ± 4.51	91.24 ± 6.03	73.54 ± 6.24	76.05 ± 6.43	61.62 ± 7.51
S23	30.83 ± 3.00	97.08 ± 6.85	77.39 ± 13.05	82.5 ± 8.02	81.32 ± 6.48	75.33 ± 7.60

A una concentración de 5 mg/dL a los 60 minutos, los extractos S3, S6, S4 y S8 presentaron inhibición de la absorción (FIGURA 7), mientras que a los 120 minutos a la misma concentración, los extractos S21, S1, S6, S4, S8, S2 y S13 presentaron inhibición de la absorción (FIGURA 8). A una concentración de 10 mg/dL a los 60 minutos, el extracto S21 mostró inhibición de la absorción (FIGURA 9), mientras que a los 120 minutos, los extractos S21, S8 y S13 mostraron inhibición (FIGURA 10) y a una concentración de 20 mg/dL a los 60 minutos, los extractos S3, S16, S5, S9, S7, S2 y S11 mostraron inhibición (FIGURA 11), mientras que a los 120 minutos, los extractos S21, S3, S5, S19, S17, S9, S11, S4 y S23 mostraron inhibición de la absorción (FIGURA 12).

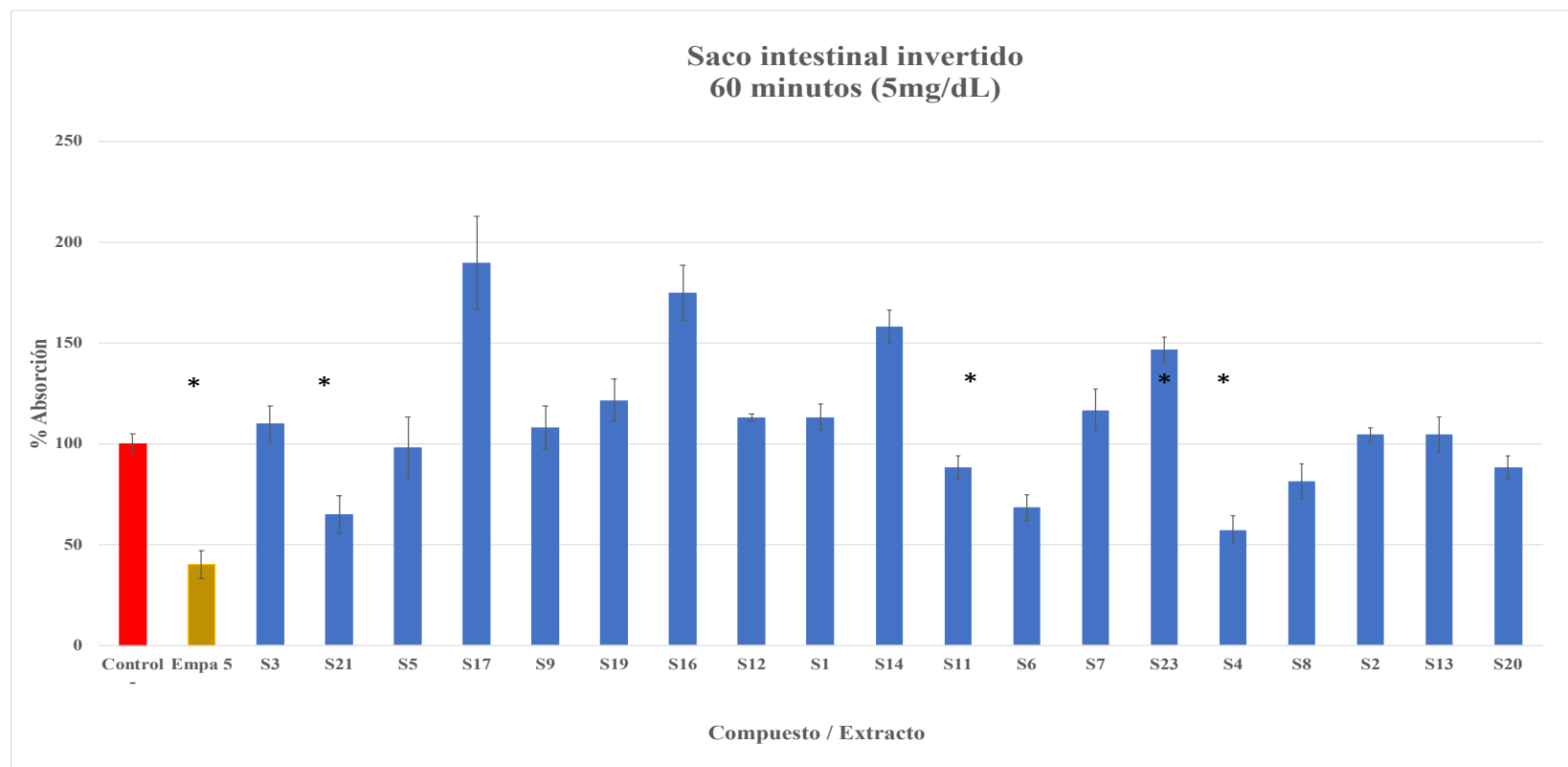


FIGURA 7. Porcentaje de absorción a los 60 minutos de extractos en dosis de 5 mg/kg

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

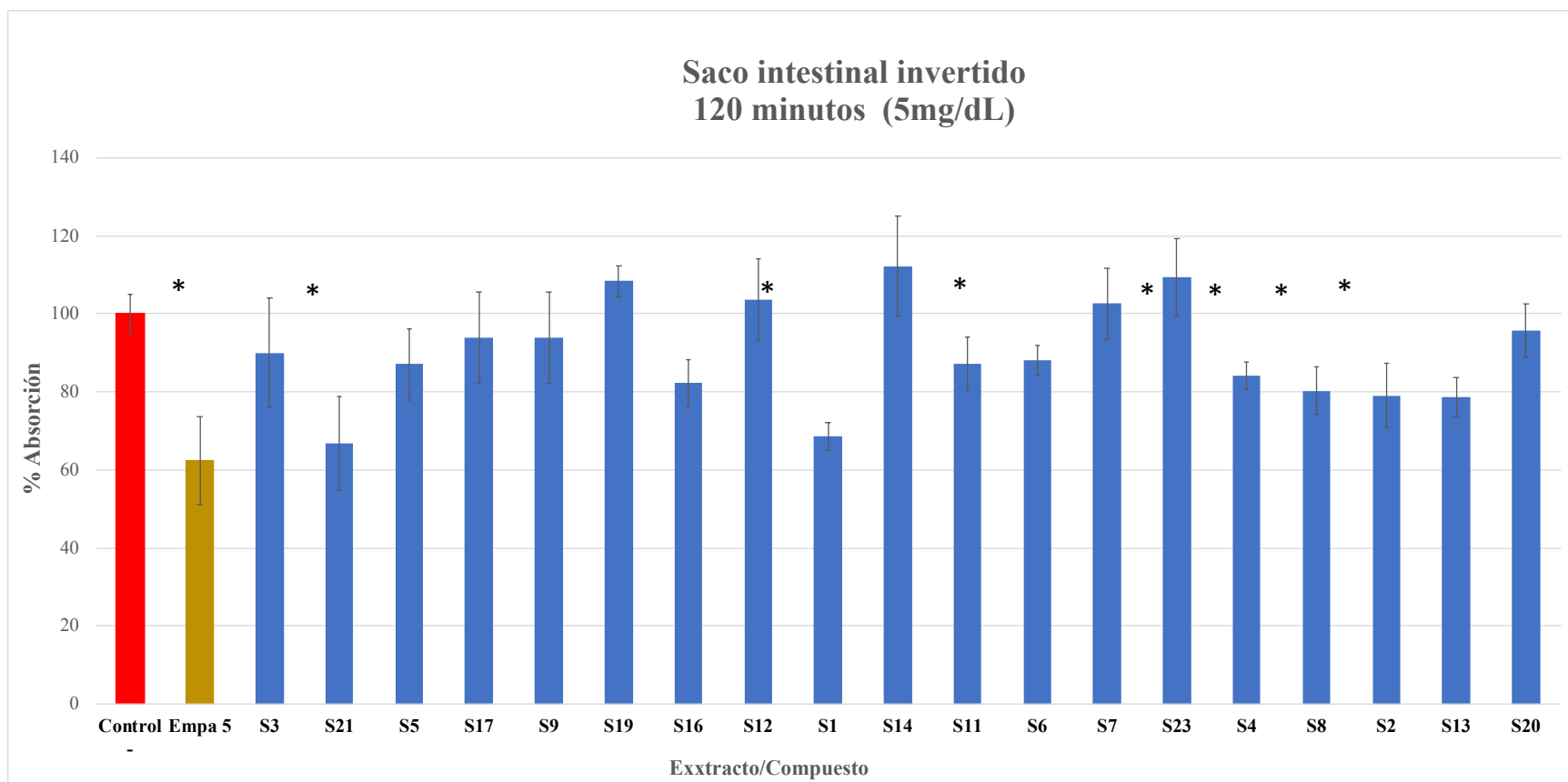


FIGURA 8. Porcentaje de absorción a los 120 minutos de extractos en dosis de 5 mg/kg

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

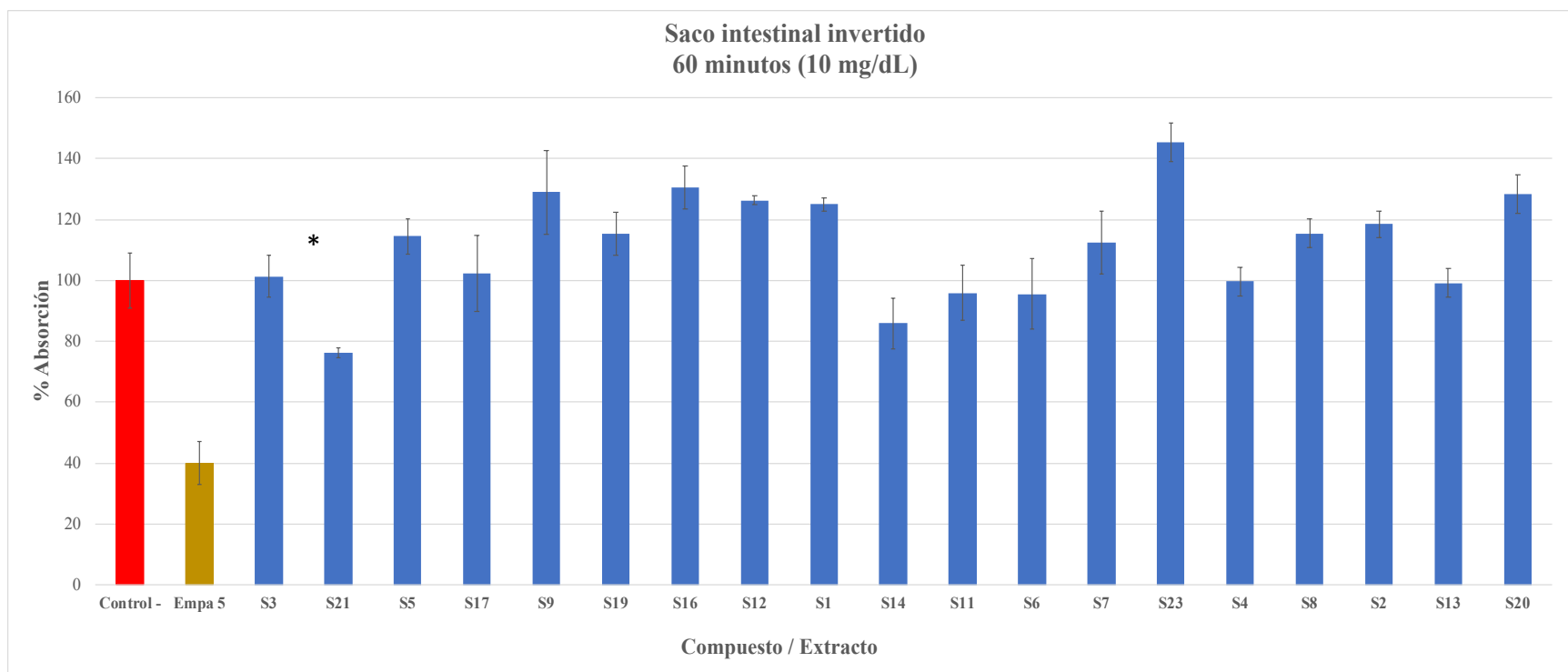


FIGURA 9. Porcentaje de absorción a los 60 minutos de extractos en dosis de 10 mg/kg

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

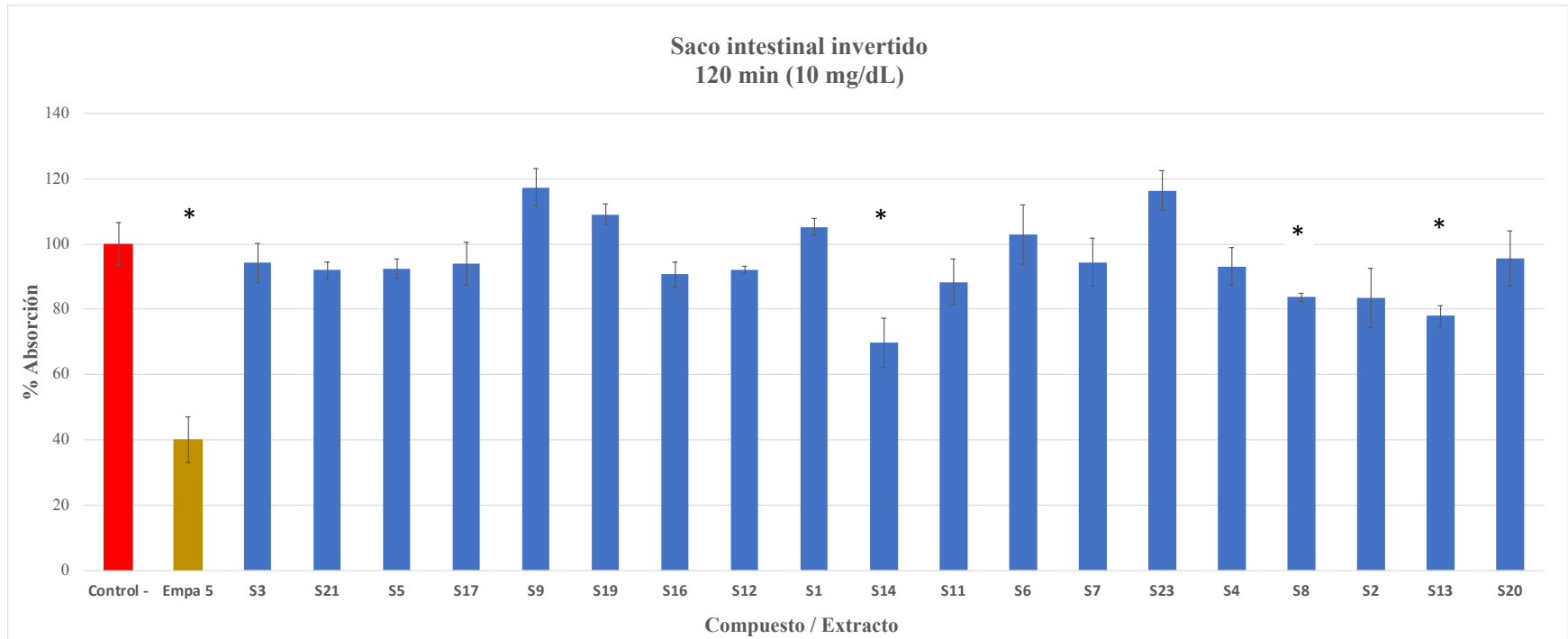


FIGURA 10. Porcentaje de absorción a los 120 minutos de extractos en dosis de 10 mg/kg

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

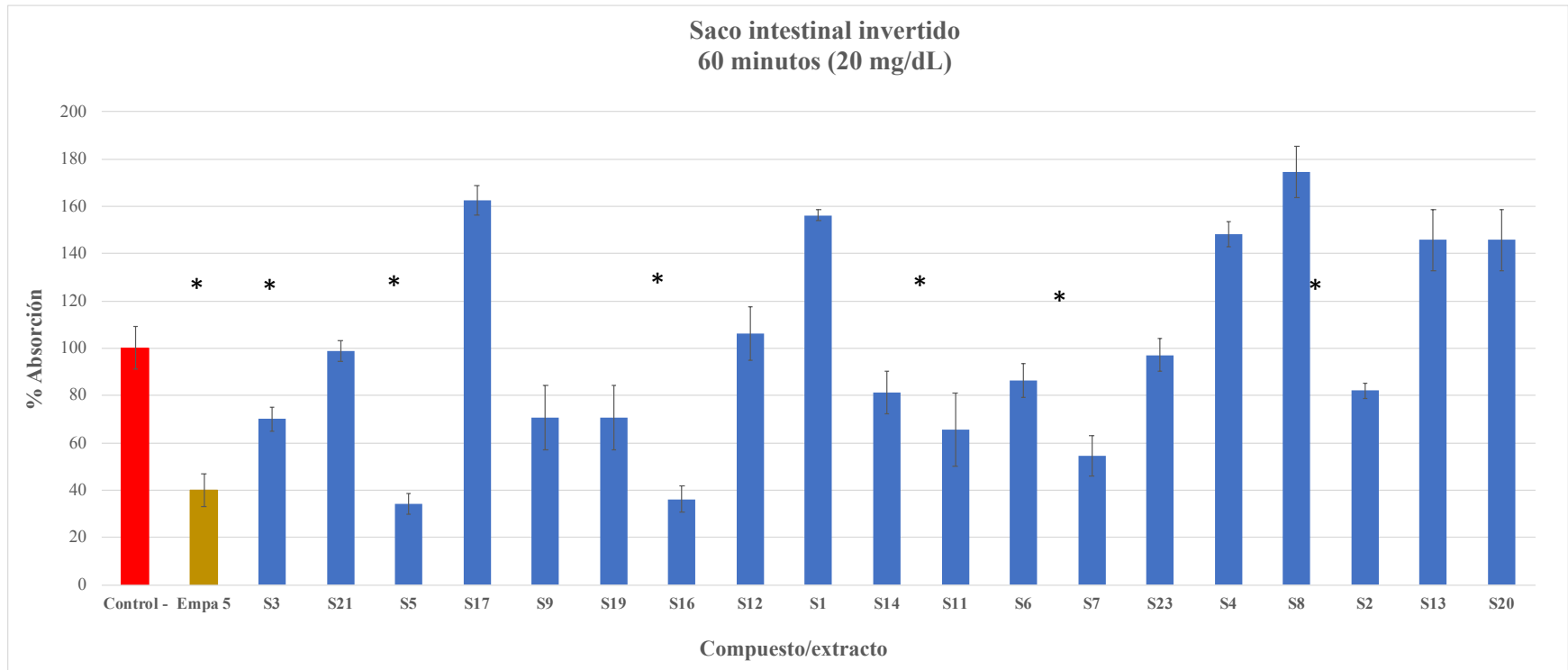


FIGURA 11. Porcentaje de absorción a los 60 minutos de extractos en dosis de 20 mg/kg

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

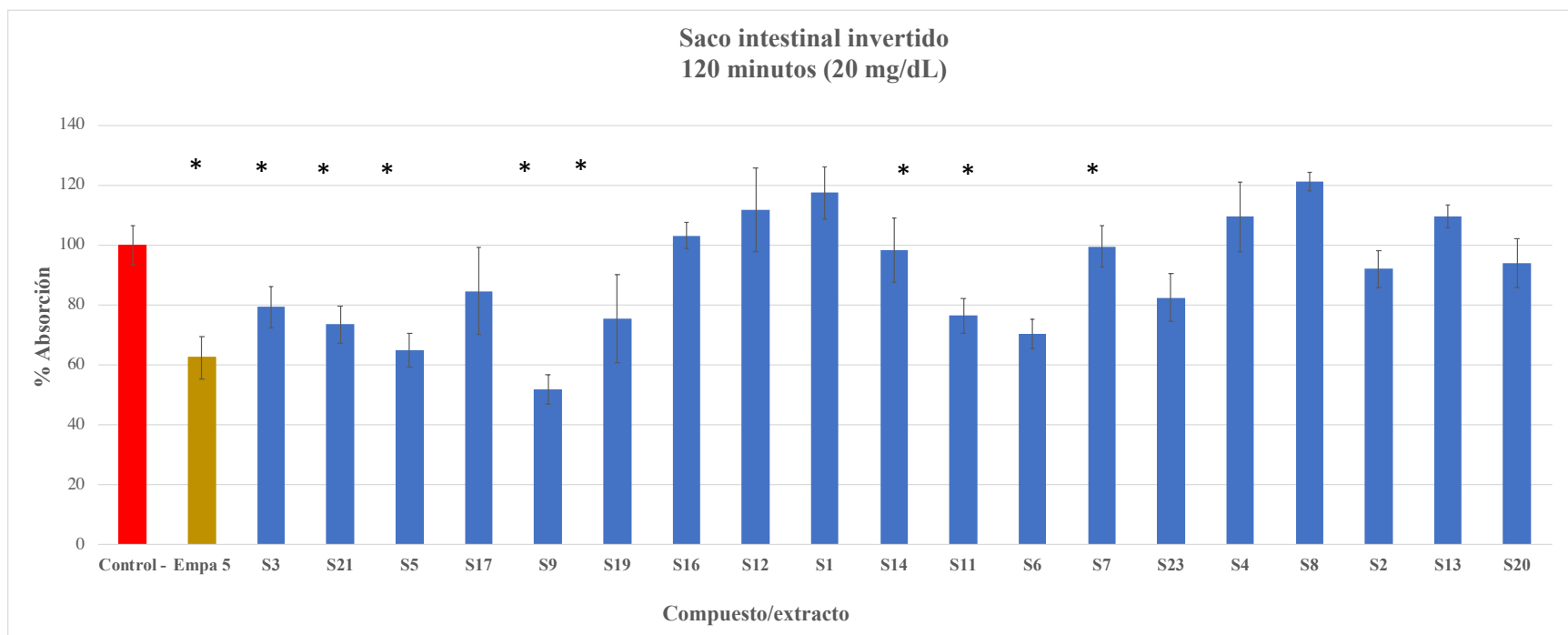


FIGURA 12. Porcentaje de absorción a los 60 minutos de extractos en dosis de 20 mg/kg

* extractos estadísticamente diferentes al control negativo considerando una $p < 0.05$ y valor de alfa de 0.05.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

La hiperglucemia posprandial es un factor que contribuye al desarrollo de varios trastornos metabólicos, como la pre-diabetes, la diabetes, la resistencia a la insulina, la obesidad y/o el síndrome metabólico (Ceriello, 2005). Estos trastornos implican un alto costo humano y económico, por lo que generan gran impacto en la salud pública a nivel nacional y mundial (OMS, 2017).

Se ha demostrado que el control de la hiperglucemia posprandial es esencial para alcanzar los niveles de glucemia recomendados. Además, es una anomalía detectable y tratable (Kanauchi, 2003).

Un enfoque interesante para limitar la hiperglucemia posprandial, es reducir o retrasar la digestión y/o absorción de carbohidratos de la dieta, mediante la inhibición de enzimas que intervienen en el metabolismo de carbohidratos (amilasa y

glucosidasas) y transportadores de glucosa (SGLT1 y GLUT2) (Abid, 2014). En particular, el intestino tiene un papel clave en la regulación de los niveles de glucosa al mediar la absorción de carbohidratos simples. La inhibición de esta absorción ha sido utilizada como un nuevo enfoque potencial para el tratamiento de la hiperglucemia (Andrianesis, 2013).

Como antecedente directo del presente trabajo se consideraron los resultados de la Tesis Doctoral de Granados Guzmán (Granados, 2017), en la cual se buscó correlacionar la actividad inhibitoria de enzimas digestivas *in vitro* con la actividad antihiper glucémica *in vivo* de múltiples extractos de diferentes plantas. Sin embargo, algunos extractos que resultaron no activos ante la inhibición de enzimas digestivas mostraron actividad antihiper glucemiante *in vivo*. Estos hallazgos sugirieron que dicha actividad podría involucrar otro(s) mecanismo(s) de acción.

Granados (2017) evaluó la inhibición de las enzimas amilasa y glucosidasa de 30 extractos y la actividad antihiper glucémica *in vivo* de la mitad de ellos. Los extractos que se encontraban disponibles de la tesis doctoral de Granados, se reunieron para evaluar su actividad citotóxica en este trabajo (Tabla V).

Los ensayos de toxicidad celular sugieren si un producto natural o químico es tóxico para las células en cultivo, generalmente determinando el número de células viables que quedan después de un periodo de incubación definido. Existen diferentes ensayos *in vitro* para evaluar toxicidad celular, como la formación de compuestos

coloreados utilizando reactivos como MTT y Resazurin; la detección de ATP con la enzima luciferasa y la medición de actividad de proteasas (Riss, 2011).

En este trabajo se utilizó el ensayo descrito por Mosmann (1983), el cual determina la cantidad de células viables a través de la reducción de MTT por la enzima succínico deshidrogenasa localizada en las mitocondrias. Se empleó doxorubicina como control positivo, un antibiótico de antraciclina con actividad antineoplásica que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos (PubChem, 2018).

La CC_{50} determinada de Doxorubicina fue de $12.33 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$. Dicha concentración fue cercana al valor reportado por Mtunzi et al. en el 2017 ($CC_{50} = 7.19 \mu\text{g/ml}$). Mtunzi trabajó con células Vero siguiendo el protocolo de Mosmann, con pequeñas modificaciones. Mtunzi utilizó 50,000 células y midió a 540 nm. En el presente trabajo, las condiciones metodológicas son iguales a las reportadas por Mtunzi y la cantidad celular generó una señal de absorbancia entre 0.580 y 0.650 unidades. De acuerdo con Skoog (2006), estos valores se encuentran dentro del intervalo de exactitud espectrofotométrica.

Los extractos metanólico de *Juglans mollis* y acetato de etilo de *Jatropha dioica* presentaron una CC_{50} de 285.72 y 256.97 $\mu\text{g/mL}$, por lo que podrían considerarse potencialmente tóxicos a concentraciones mayores, mientras que el resto de los extractos presentaron una $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$, representando una mayor seguridad en su uso.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de extractos de plantas sobre la actividad antihiper glucémica *in vivo* e *in vitro*; como controles positivos se utilizaron fármacos estándar que se ha comprobado que atenúan los niveles de glucosa postprandial, la acarbosa para la inhibición de enzimas digestivas (amilasa y glucosidasa) y la empaglifozina para inhibir el transporte intestinal de glucosa *ex vivo*.

Se evaluaron 11 extractos, a través del ensayo de tolerancia oral al almidón (FIGURAS 3-5). Como se describió previamente por Granados (2017), ninguno de ellos presentó inhibición *in vitro* de las enzimas digestivas (α -amilasa y α -glucosidasa).

Se evaluaron tres grupos diferentes: 1) un control negativo que representó la digestión y absorción normal después de una carga de carbohidratos complejos; 2) un control positivo en el cual se utilizó acarbosa como inhibidor de la digestión del almidón; 3) los grupos experimentales, en los que se evaluaron tres diferentes dosis de cada extracto. Se administró el almidón vía oral para que se llevara a cabo la digestión del carbohidrato complejo y la absorción de glucosa, ya que de administrar glucosa (por ejemplo en el test de tolerancia oral a la glucosa) solo se evaluaría la absorción intestinal del monosacárido (Dona, 2019).

Si bien, se tenía como antecedente que los extractos incuídos no inhibían enzimas digestivas, la prueba representó un cribado para considerar algún extracto con potencial actividad antihiper glucémica *in vivo*.

El tiempo real que toma el proceso de digestión y comienza el de absorción es difícil de especificar, ya que involucra varios factores que difieren entre sí, como la pérdida del almidón, la aparición de oligosacáridos y aparición de glucosa. De acuerdo con Dona (2010), alrededor de los 15 minutos el pico glucémico postprandial suele ser más alto.

En la figura 2, donde se muestran las cinéticas de los controles se puede observar que la mayor tasa de glucosa absorbida sucedió entre los 15 y 30 minutos; por lo cual se decidió comparar los valores normalizados de glucemia observados a los 15 minutos. Como se puede observar en la misma figura, la administración de Acarbosa en una dosis de 0.5 mg/kg logró reducir significativamente la hiperglucemia inducida por el almidón a los 15 y 30 minutos. Para el análisis estadístico se realizó una prueba t student para la comparación de las medias de dos muestras suponiendo varianzas iguales considerando un valor de $p < 0.05$ y alfa de 0.05 para confirmar de manera estadística este resultado.

Existen estudios en animales que apoyan las propiedades antidiabéticas de algunas plantas por su contenido de metabolitos secundarios, como polifenoles, flavonoides, terpenos, etc., y su potencial para la prevención y tratamiento de diabetes tipo 2 (Ota, 2017). Algunos de los diferentes mecanismos responsables de sus efectos anti-hiperglucémicos y/o hipoglucémicos, son: la inhibición de digestión de carbohidratos y/o absorción de glucosa en el intestino, estimulación de la secreción de insulina, modulación de liberación de glucosa desde el hígado, activación de receptores de

insulina, captación de glucosa en tejidos y modulación de las vías de señalización intracelular (Hanhineva ,2010; Bahadoran, 2013).

Por otro lado, el análisis de la absorción de monosacáridos brinda información sobre aquellos productos que representan una alternativa en la prevención y/o tratamiento de diferentes enfermedades metabólicas. Entre las técnicas que evalúan este mecanismo *in vitro*, se encuentran los aislados de intestino, las membranas naturales y artificiales; técnicas *in situ*, preparaciones celulares y también aquellas que emplean elementos subcelulares (Marano, 1991).

La técnica del intestino aislado de rata es la más utilizada en el estudio de absorción de sustancias. La preparación del saco intestinal empleado por Wiseman (1954), constó de un trozo de intestino que es invertido y colocado en solución fisiológica adicionada con la sustancia a evaluar a 37°C, la adición de sales y aireación. Se ha demostrado que los tejidos mantienen su capacidad metabólica por un término de dos a tres horas luego de ser aislados. Además, destacan la importancia de la plenitud de la estructura de la membrana en la transferencia de sustancias. Levine (1970) reportó que hay cambios de tejido epitelial y en la absorción según el modo de sacrificio de las ratas; por ejemplo los órganos aislados de animales decapitados, manifiestan un total desprendimiento del borde epitelial alrededor de 60 minutos de haberse iniciada la experimentación, mientras que cuando se anestesian los animales con solventes, de un 15 a 30% de las células aparecen dañadas y la anestesia con algunos fármacos como ketamina, afecta la absorción. Feldman (1976) destaca que la acción peristáltica del intestino sirve como indicador de la viabilidad de este. El peristaltismo se mantiene por periodos de 1 a 3

horas cuando se emplean sacos intestinales invertidos, lo que confirma la viabilidad del intestino durante ese tiempo.

Este modelo fue utilizado para evaluar la tasa de absorción intestinal de glucosa. Se realizó el modelo diseñado por Wilson & Wiseman en 1954 (Apartado 5.3). La figura 6 muestra la cinética de la absorción normal (sin inhibición / control negativo) y una cinética con inhibición de la absorción (control positivo). Se observa proporcionalidad entre el tiempo de incubación y la concentración de glucosa en el interior del saco ($r=0.99$), lo que demuestra el transporte de glucosa a través del tejido durante el tiempo de incubación. En la estadística de regresión, la pendiente tiene un valor <0.05 lo que indica que la variable dependiente (concentración de glucosa en el interior del saco) depende de la variable independiente (tiempo de incubación) (Jurado, 2008).

La proporcionalidad entre la absorción de glucosa y el tiempo permite observar y/o evaluar un efecto de inhibición de la absorción. El efecto de inhibición puede mostrarse durante la primera hora, hasta la segunda hora o bien, durante las dos primeras horas (Hanhineva, 2010).

15 de los 19 extractos evaluados mostraron inhibición de la absorción intestinal de glucosa (FIGURAS 7-12). Solo el extracto hidroalcohólico (70%) de *Hamelia patens* presentó inhibición de la absorción a las tres dosis evaluadas, además cuatro extractos, presentaron a dos concentraciones evaluadas, los extractos metanólico de *Uncaria tomentosa*, butanólico de *Juglans mollis* (5 y 20 mg/dL), butanólico de *Hamelia patens*, y de acetato de etilo de *Jatropha dioica* (5 y 10 mg/dL). Mientras que diez extractos

presentaron inhibición de la absorción en una sola concentración evaluada, el extracto de acetato de etilo de *Juglans mollis* y el extracto acuoso de *Ceanothus cearuleus* (5 mg/dL), hidroalcoholico (90%) de *Jatropha dioica* (10 mg/dL), metanólico de *Juglans mollis*, metanólico de *Chrysactinia mexicana*, acuoso de *Juglans mollis*, metanólico de *Hamelia patens*, metanólico de *Persea americana* e hidroalcoholico (90%) de *Salvia beateflora* (20 mg/dL).

Tres extractos en diferentes concentraciones mostraron un efecto de inhibición durante la primera hora, 14 extractos en diferentes concentraciones tuvieron un efecto hasta la segunda hora de incubación y cuatro extractos a diferentes concentraciones mostraron un efecto de inhibición durante las dos primeras horas de incubación.

Ocho de los 23 extractos que fueron facilitados para este trabajo, mostraron actividad antihiper glucémica *in vivo*, inhibición de enzimas digestivas *in vitro* y presentaron inhibición de la absorción intestinal de glucosa, lo que sugiere que estas vías fisiológicas pudieran estar involucradas en su actividad antihiper glucémica. Por otro lado, seis extractos mostraron actividad antihiper glucémica *in vivo*, aunque fueron reportados sin inhibición enzimática (Granados, 2017) en este trabajo se demostró que inhiben la absorción intestinal de glucosa, lo que sugiere que la inhibición de los transportadores intestinales (ya sea SGLT y/o GLUT) podría ser responsable de su actividad antihiper glucémica. Mientras que, un extracto con actividad antihiper glucémica *in vivo* fue reportado sin inhibición enzimática (Granados, 2017) y en este trabajo se determinó que no posee inhibición de la absorción intestinal de glucosa. Su actividad pudiera deberse a otras vías fisiológicas, como la estimulación

de la liberación de insulina de las células pancreáticas, el aumento del número de transportadores de glucosa (no intestinales), o la inhibición de la gluconeogénesis (Hanhineva, 2010).

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. Los extractos: acuoso, butanólico, metanólico y acetato de etilo de *J. mollis*, metanólicos de *U. tomentosa* y *C. mexicana*, acuoso de *C. caeruleus* y butanólico de *H. patens*, no mostraron ser potencialmente citotóxicos y mostraron inhibición de la absorción intestinal de glucosa *in vitro*. Por lo que la actividad antihiper glucémica *in vivo* reportada previamente, también involucra la disminución de absorción intestinal.
2. Los extractos: metanólico e hidroalcohólico (70%) de *H. patens*, metanólicos de *P. americana* y *R. communis* e hidroalcohólico de *S. beateflora* no mostraron ser potencialmente citotóxicos y el extracto acetato de etilo de *J. dioica* mostró una leve citotoxicidad, mostraron inhibición de la absorción intestinal de glucosa *in vitro*. Por lo que la actividad antihiper glucémica reportada ocurre a través de la disminución de absorción intestinal.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

1. Realizar aislamiento biodirigido de los extractos con actividad antihiper glucémica *in vivo* y/o *in vitro*, para encontrar el o los compuestos responsables de dicha actividad.
2. Evaluar los extractos a través de ensayos que involucren otras vías fisiológicas.
3. Evaluar concentraciones mayores y/o menores tanto en los ensayos de absorción intestinal como en actividad antihiper glucémica *in vivo* para determinar el efecto sobre curvas dosis – respuesta.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abid, S., Lekchiri, A., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Aziz, M., Bnouham, M. (2014) Inhibition of α -glucosidase and glucose intestinal absorption by *Thymelaea hirsuta* fractions. *Journal of Diabetes*, 6, 351-359.
- Andrianesis, V., Doupis, J. (2013). The role of kidney in glucose homeostasis SGLT2 inhibitors, a new approach in diabetes treatment. *Clinic Pharmacology*, 6, 519-539.
- Asociación Americana de Diabetes. (2013). Estrés: El efecto del estrés en la hiperglucemia. Recuperado de <http://www.diabetes.org/es/vivir-con-diabetes/complicaciones/estres.html?referrer=https://www.google.com.mx/> (Sitio web visitado en Julio 15, 2018).
- Asociación Mexicana de Diabetes (2016). Carbohidratos e Índice Glucémico. Recuperado de <http://amdiabetes.org/carbohidratos-e-indice-glucemico> (Sitio web visitado en Julio 15, 2018).
- Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J. (2007). Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 147, 386-399.
- Carvalheira, J. B.C., Zecchin, H. G., Saad, M. J. A. (2002). Vías de señalización de Insulina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinología & Metabología*, 46 (4), 419-425.
- Ceriello, A. (2005). Postprandial hyperglycemia and diabetes complications is it time to treat?. *Diabetes*, 54, 1-7.

- Chao, E. C., Henry, R. R. (2010). SGLT2 inhibition – a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews*, 9, 551-559.
- Cobelli, C., Man, C. D., Toffolo, G. Basu, R., Vella, A., Rizza R. (2014). The Oral Minimal Model Method. *Diabetes*, 63, 1203-1213.
- Collier, B., Dossett, L., May, A., Díaz, J. (2008). Glucose control and the inflammatory response. *Nutrition Clin Practice*, 23, 3-15.
- Cummings, J. H., Stephen, A. M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61 (S1), S5-S18.
- Eli Lilly. (2016). Open Innovation Drug Discovery: Biological Evaluation. Recuperado de <https://openinnovation.lilly.com/dd/what-we-offer/biological-eval.html> (Sitio web visitado Julio 15, 2018).
- Elia, M., Cummings, J. H. (2007). Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61 (S1), S40-S74.
- Englyst, K. N., Liu, S., Englyst, H. N. (2007). Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61 (S1), S19-S39.
- Federación Internacional de la Diabetes. (2017). About Diabetes: What is diabetes. Recuperado de <https://www.idf.org/about-diabetes/what-is-diabetes> (Sitio web visitado en Julio 12, 2018).
- Federación Mexicana de Diabetes. (2017). Hiperglucemia (3) Recuperado de <http://fmdiabetes.org/hiperglucemia-glucosa-alta/> (Sitio web visitado en Julio 11, 2018).
- Ferrier, D. R., (2014), *Biochemistry*. Philadelphia, USA. Lippincott Williams & Wilkins editorial.
- Ganong, W. F., (2002), *Fisiología médica*. San Francisco, USA. Traducción al español: Arias, G. Editorial El Manual Moderno.
- Granados, G. (2017). Optimización y Validación de Ensayos *in vitro* a micro escala indicadores de actividad Antirradicalaria y Antihiper glucémica, en extractos de plantas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- International Diabetes Federation. (2017). DIABETES, ATLAS DE LA IDF (8va edición).
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B. (2012). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach: Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, 35 (6), 1364-1379.
- Jácome, A. (2005) Fisiología Endocrina. 3era Edición. Academia Nacional de Medicina, Bogotá, Colombia.
- Kanauchi, M., Nakajima, M., Saito, Y., Kanauchi, K. (2003). Pancreatic beta-cell function and insulin sensitivity in Japanese subjects with impaired glucose tolerance and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 52, 476 – 481.
- Mali, P. (2017). Cytotoxicity activities of chloroform extract of *Cichorium intybus* seed against HCT-15 and Vero cell line. *International Journal of Health & Allied Sciences*, 4, 267-270.
- Manzanares, W., Aramendi, I. (2010). Hiperglucemia de estrés y su control con insulina en el paciente crítico: evidencia actual. *Medicina Intensiva*, 34 (4), 273-281.
- Mathers, C. D., Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine* 3 (11), 430-442.
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Mtunzi, F., Ejidike, I., Ledwaba, I., Ahmed, A., Pakade, V., Klink, M., Modise, S. (2017). Solvent-solvent fractionations of *Combretum erythrophyllum* (Burch.) leave extract: Studies of their antibacterial, antifungal, antioxidant and cytotoxicity potentials. *Journal of Tropical Medicine*, 10 (7), 670-679.
- National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIH). (2013). Your Guide to Diabetes: Type 1 and Type 2.
- Nugent, B. (2005). Hyperosmolar Hyperglycemic State. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 23 (3), 629-648.

- Nuñez, P., Segura, M., Negrete, E., Acevedo, J., Betancur, D., Chel, L., Castañeda, G. (2018). Portein hydrolysates and ultrafiltered fractions (<1kDa) from *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris* and *Mucuna pruriens* exhibit antihyperglycemic activity, intestinal glucose absorption and α -glucosidase inhibition with no acute toxicity in rodents. *Journal of the Science of food and agriculture*, DOI: 10.1002/jsfa.9219.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2002). Alimentación y nutrición (N° 29). Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0d.htm#bm13x> (Sitio web visitado en Julio 15, 2018)
- Organización Mundial de la Salud (2017). Informe mundial sobre la diabetes: Resumen de Orientación. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204877/1/WHO_NMH_NVI_16.3_sp.pdf (Sitio web visitado en Julio 15, 2018)
- Organización Panamericana de la Salud. (2012). Marco Internacional de la Diabetes. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6720&Itemid=39450&lang=es (Sitio web visitado en Julio 12, 2018).
- National Center for Biotechnology Information. Doxorubicin-PubChem Compound Database. Recuperado de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31703> (Sitio web visitado en Agosto 14, 2018).
- Riddle, M. (2018). Standards of medical care in Diabetes. *The Journal of Clinical and Applied Research and Education*, 41 (1), 73-86.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. *Mammalian Cell Viability*, 740, 103-114.
- Sarwar, N., Gao, P., Seshasai, S. R., Gobin, R., Kaptoge, D. (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. Emerging Risk Factors Collaboration. *Lancet*, 26 (375), 2215-2222.
- Skoog, D., Holler, F., Couch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*, Ciudad de México, México, Cengage Learning. 6ta Edición.

- Suffness, M., Pezzuto, J. (1990). Assays related to cancer drug discovery. *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, 6, 71-133.
- Villanueva, V. (2003). Complicaciones Agudas de la Diabetes mellitus. *Revista de Posgrado de Vía Catedra de Medicina*, 130, 19-24.
- Wilson, T., Wiseman, G. (1954). The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. From the medical research council unit for research in cell metabolism. *Journal of Physiology*, 123, 116-125.