



Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Facultad de Farmacia



**“Estudio fitoquímico preliminar y
determinación del efecto antidiabético
subagudo del extracto hidroalcohólico de
Plantago australis”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA:

L.F. KATHIA GISELA ORNELAS MENDOZA

**DIRECTORES DE TESIS: DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO
DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA**

Cuernavaca, Morelos

Junio 2022

AGRADECIMIENTOS

A **CONACyT** por la beca (765718) otorgada para el proyecto de investigación.

Al financiamiento interno otorgado por la **Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos** (UAEM) para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Julio Cesar Rivera** por su colaboración en el estudio fitoquímico preliminar.

Al comité revisor: **Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Sergio Alcalá Alcalá, Dra. Irene Perea Arango, Dr. Julio Cesar Almanza Pérez, Dr. Samuel Estrada Soto** por el tiempo dedicado a realizar las observaciones necesarias para mejorar este trabajo.

A los directores de tesis **Dr. Samuel Estrada Soto y Dr. Rafael Villalobos Molina** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, compartir sus conocimientos y apoyo brindado.



DEDICATORIAS

Contenido

Índice de tablas	0
Índice de figuras	0
Índice de gráficas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	6
ANTECEDENTES	9
El páncreas y su papel en la Diabetes	10
Liberación y acciones celulares de la insulina	11
Regulación en el transporte de glucosa	13
Resistencia a la insulina.....	14
Diabetes	14
Clasificación de la diabetes	15
Diabetes tipo 1	16
Hiperglucemia en el embarazo	16
Otros tipos de diabetes	17
Diabetes tipo 2	17
Diagnóstico de la Diabetes tipo 2.....	20
Estadísticas en México y en el mundo	20
Opciones terapéuticas para el tratamiento de la Diabetes tipo 2	22
Efectos y mecanismos en la sensibilización de la insulina	24
Medicina tradicional mexicana	25
<i>Plantago australis</i> Lam.....	26
Etnobotánica y antecedentes etnomédicos.....	27
Evidencia científica de <i>Plantago australis</i> Lam.....	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	33
Objetivo general.....	34
Objetivos específicos.....	34
METODOLOGIA.....	35
Obtención del material vegetal.....	36

“Estudio fitoquímico preliminar y determinación del efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis*”

Obtención del extracto hidroalcohólico.....	36
Estudio fitoquímico preliminar: identificación y cuantificación de Ácido ursólico (AU) por método de HPLC.....	36
Uso y manejo de los animales de experimentación.....	37
Determinación antihiper glucémica del EHAPa	37
Inducción a la diabetes experimental no insulino dependiente.....	37
Determinación de la actividad antidiabética aguda.....	37
Estudio antidiabético subagudo.....	38
Análisis del % de variación de glucemia	38
Análisis del perfil de glucosa y lípidos	39
Análisis de expresión génica en tejido adiposo.....	¡Error! Marcador no definido.
Análisis estadístico de datos	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Identificación y cuantificación de UA.....	41
Determinación antihiper glucémica: Curvas de tolerancia a la glucosa	42
Determinación de la actividad antidiabética aguda.....	44
Estudio antidiabético subagudo.....	46
Variación de glucemia	46
Variación de pesos	48
Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.
Referencias.....	50

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aP2	Proteína de unión a ácidos grasos
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
CEIB	Centro de Investigación en Biotecnología
DENID	Diabetes Experimental no Insulinodependiente
DG	Diabetes gestacional
DT1	Diabetes tipo1
DT2	Diabetes tipo 2
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EHAPa	Extracto Hidroalcohólico de <i>Plantago australis</i>
EAcE	Extracción con acetato de etilo del extracto de <i>Plantago australis</i>
GO	Glucosa en tiempo 0
GLUT	Transportador de glucosa
HPLC	Cromatografía de alta eficacia
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IRS	Sustrato receptor de insulina
KATP	Canales de Potasio sensibles a ATP
Kg	Kilogramo
Min	minuto
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleótido reducido
ND	Nicotinamida
NOM	Norma Oficial Mexicana
<i>P. australis</i>	<i>Plantago australis</i>
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PPRE	Elementos de respuesta específicos de PPAR
RI	Resistencia a la insulina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RXR	Factor retinoide X
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
STZ	Estreptozotocina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TZD	Tiazolidinedionas
T0	Tiempo 0
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

**“Estudio fitoquímico preliminar y determinación del
efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico
de *Plantago australis*”**

Índice de tablas

Tabla 1. Antidiabéticos orales	23
Tabla 2. Cuantificación de Ácido Ursólico	42

“Estudio fitoquímico preliminar y determinación del
efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico
de *Plantago australis*”

Índice de figuras

Figura 2. Representación pancreática	11
Figura 3. Síntesis de la insulina	13
Figura 4. Complicaciones de la diabetes	15
Figura 5. Criterios de diagnóstico modificados para la diabetes	19
Figura 6 Estadísticas de mortalidad.....	20
Figura 7. Principales causas de muerte en México	20

“Estudio fitoquímico preliminar y determinación del
efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico
de *Plantago australis*”

Índice de gráficas

Gráfica 1. Curva de Tolerancia a la Glucosa de EHAPa y EAcE	44
Gráfica 2. Determinación antidiabética aguda de EHAPa y EAcE.	45
Gráfica 3. Estudio antidiabético subagudo del EHAPa (glucosa al tiempo 0).	47
Gráfica 4. Estudio antidiabético subagudo del EHAPa (glucosa al tiempo 5).	48
Gráfica 5. Porcentaje de variación de pesos.	49



RESUMEN



La diabetes tipo 2 (DT2) es un problema mundial de salud pública que amenaza a las economías de todas las naciones, en particular de los países en desarrollo. Impulsada por la rápida urbanización, la transición de la nutrición y los estilos de vida cada vez más sedentarios, la epidemia ha crecido en paralelo con el aumento mundial de la obesidad, posicionándose en los primeros lugares de morbilidad. Esto se debe, principalmente a los procesos fisiopatológicos que desencadena a nivel del metabolismo, entre los que se destaca la resistencia a la insulina.

Actualmente, existen muchos fármacos utilizados para el tratamiento de la DT2, sin embargo, el tiempo prolongado al que está expuesto el paciente a este tipo de tratamientos genera tolerancia y hace que lleve consigo efectos adversos, es por eso que surge la necesidad de encontrar nuevas moléculas bioactivas con potencial uso en la terapia de esta enfermedad.

Organización Mundial de la Salud reconoce y promueve el uso de las plantas medicinales tradicionales como recurso médico. A pesar de estas recomendaciones y de la gran tradición de uso terapéutico, la investigación científica en este campo es mínima (**Organización Mundial de la Salud 2019**), en este sentido, los productos naturales son utilizados como tratamiento complementario para este y otros padecimientos y, representan una fuente importante para la obtención de moléculas novedosas que actúan en blancos específicos con potencial uso en la terapéutica, así mismo, pueden servir como base para semisíntesis de nuevos compuestos bioactivos con potencial efecto terapéutico. De esta forma, el estudio científico de especies vegetales empleadas en la medicina tradicional resulta de suma importancia, en este sentido el presente proyecto de investigación pretende continuar con el estudio de *Plantago australis*, especie vegetal a la que se le ha demostrado actividad antidiabética en estudios recientes mediante un modelo diabetes experimental no insulino dependiente (DENID) en ratones, mediada principalmente por el incremento de la expresión de PPAR- γ y GLUT-4 observado en modelos *in vitro* (**Ornelas Mendoza 2018**), además de ser una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones (**UNAM 2009**).



En este proyecto se determinó el potencial efecto antihiper glucémico de *Plantago australis*, mediante curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) en ratas normoglucémicas y ensayos antidiabéticos agudo y subagudo en un modelo DENID generado por la administración de nicotinamida (ND) y estreptozotocina (STZ). Además, se identificó y cuantificó ácido ursólico (AU) en el extracto hidroalcohólico (EHAPa) y una extracción realizada con acetato de etilo (EAcE).

Se realizaron CTG en ratonas normoglucémicas, en donde se evaluó el EHAPa y la extracción con acetato de etilo utilizando una dosis de 100 mg/kg, su vehículo (agua) y glibenclamida, esto con la finalidad de observar su comportamiento metabólico y absorción de la glucosa, la CTG confirmó el efecto antihiper glucémico que posee el EHAPa y la EAcE al oponerse al pico hiper glucémico en comparación con el vehículo.

Por otro lado, se realizó el ensayo antidiabético agudo, en donde se evaluó el EHAPa y la EAcE, los resultados mostraron que el EHAPa y la EAcE posee actividad antidiabética, al disminuir los niveles de glucemia en comparación con el vehículo.

Adicionalmente, se cuantificó e identificó AU en ambos extractos y se confirmó su presencia utilizando un método por HPLC, se determinó que el EHAPa contiene 0.7 % de AU, mientras que el EAcE contiene 4.0 % de AU.

En conclusión, *Plantago australis* mostró efectos antihiper glucémicos y antidiabéticos significativos en los modelos animales empleados, sugiriendo la participación de un posible mecanismo insulinosensibilizador. Adicionalmente, se pudo demostrar la presencia de AU dentro de su composición.



ABSTRACT

Diabetes is a serious and chronic condition that is triggered by hyperglycemia. This occurs when the body can't produce insulin, when the amount of insulin that produces



is insufficient or when the body can't use it effectively (Pan American Health Organization 2010).

Insulin is an essential hormone produced by the pancreas. It allows the glucose located in the bloodstream to enter the cells of the body, where it carries out its function. In addition, it is essential for the metabolism of proteins and lipids. The lack of insulin or the inability of the cells to respond to it, derives from hyperglycemia, a clinical indicator of diabetes (REF).

Without long-term blood glucose control, organs in the body can be seriously damaged, leading to disabling and life-threatening health complications such as cardiovascular diseases (CVD), nerve damage (neuropathy), kidney disease (nephropathy) and eye disease (causing retinopathy, vision loss, and even blindness). However, with the proper diabetes treatment, these serious complications can be delayed or even prevented.

There are several types of diabetes with different etiology. People with type 1 diabetes (T1D) have insulin deficiency and people with T2D develop insulin resistance; in both cases the patients have chronic hyperglycemia (Dunning, 2013). The current pharmacological treatment of diabetes is intended to prevent the progression of the disease, but the costs of this type of treatments constitute a burden for patients and health services. However, despite the gloomy panorama described, today's knowledge allows establishing new strategies that act more effectively against this specific disease, contributing not only to the treatment, but also to the complications that it generates, with the help of the study of herbal medicine. (Ceron, 2016). Therefore, the present project carries out a preliminary phytochemical study to detect some components responsible for the described antidiabetic activity of *Plantago australis*, as well as to study the impact of the hydroalcoholic extracts on chronic hyperglycemia, dyslipidemia and proinflammatory processes generated in a subacute experimental diabetes model.



INTRODUCCIÓN



La diabetes es una afección crónica y grave que se desencadena por hiperglucemia, esto ocurre cuando el organismo no puede producir insulina o la cantidad que produce es insuficiente, o cuando el organismo no puede utilizarla de manera eficaz (**Organización Panamericana de la Salud 2010**).

La insulina es una hormona indispensable producida por el páncreas, favorece que la glucosa del torrente circulatorio ingrese en las células del cuerpo, donde lleva a cabo su función. Además, es fundamental para el metabolismo de proteínas y lípidos. La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a ella deriva de la hiperglucemia, indicador clínico de la diabetes (REF).

De no controlar la glucemia a largo plazo, los órganos del cuerpo pueden resultar dañados, lo que derivaría en complicaciones de la salud incapacitantes y potencialmente mortales, como las enfermedades cardiovasculares (ECV), lesión de los nervios (neuropatía), enfermedad renal (nefropatía) y afección ocular (causante de la retinopatía, la pérdida de visión e incluso la ceguera). Sin embargo, si se tiene el tratamiento apropiado de la diabetes, estas graves complicaciones se pueden retrasar o prevenir. Existen varios tipos de diabetes con diferente etiología, generalmente las personas que padecen diabetes tipo 1 (DT1) tienen insulinodeficiencia, y las personas con DT2 desarrollan insulinoresistencia y en ambos casos cursan con hiperglucemia crónica (**Dunning, 2013**). El tratamiento farmacológico actual de la diabetes tiene como propósito evitar el avance de la enfermedad, pero los costos económicos constituyen una carga para los pacientes y los servicios de salud. Sin embargo, a pesar del sombrío panorama descrito, el conocimiento de hoy en día permitirá establecer nuevas estrategias que actúen de manera efectiva contra esta enfermedad, coadyuvando no solo al tratamiento, sino a las complicaciones que esta genera, con ayuda del estudio de medicina herbolaria (**Cerón, 2016**). En este sentido, el presente proyecto realiza un estudio fitoquímico preliminar para detectar, algunos componentes responsables de la actividad antidiabética descrita de *Plantago australis*, así como estudiar el impacto del extracto hidroalcohólico en la hiperglucemia crónica, la dislipidemia y los procesos proinflamatorios generados en un modelo subagudo de diabetes experimental.



ANTECEDENTES



El páncreas y su papel en la Diabetes

Estructura pancreática

El páncreas es una glándula mixta, contiene tejido exocrino conformado por células acinares productoras de enzimas digestivas; y también es un tejido endocrino compuesto por las células de los islotes de Langerhans, que producen hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa (Fig. 1). En conjunto, los islotes representan 5-20 % del peso de la glándula.

El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular, que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad. El tejido endocrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, estas células son: células productoras de insulina o β , que representan el 70 %; células productoras de glucagón o α , que representan el 20 %; las células productoras de somatostatina o δ , que representan entre el 5 y 10 %, y las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor del 2 %. Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromafines). Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia. La organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular. Otro tipo celular es el parecido a las células neuronales de Schwann, ocupan menos del 1 % y se cree que podrían ser importantes en la regeneración pancreática (Olvera, Amador y Hernandez 2008).

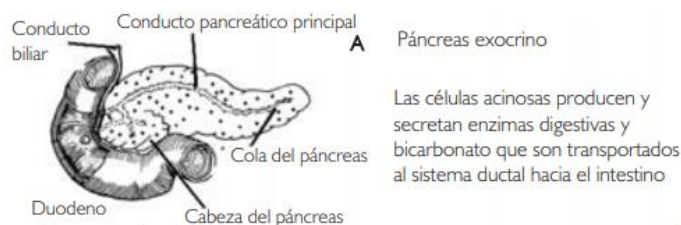




Figura 1. Representación pancreática

Se aprecia su localización en la segunda porción del duodeno, el conducto pancreático principal y las divisiones del páncreas (cabeza, cuerpo y cola) (A). En B se observan las células acinosas del tejido exocrino y en el esquema inferior se observa la representación de un islote de Langerhans con los respectivos porcentajes de células endocrinas: α -productoras de glucagón, β -productoras de insulina, δ -productoras de somatostatina, PP-productoras de polipéptido pancreático y células de Schwann. Modificado de Vinik et al, 2004.

Liberación y acciones celulares de la insulina

La liberación de insulina es un proceso indispensable en la homeostasis del cuerpo como respuesta al aporte energético por el consumo de alimentos. Su liberación es inducida principalmente en respuesta al incremento de glucemia, pero al mismo tiempo es regulada por diversas sustancias (nutrimentos, hormonas gastrointestinales, hormonas pancreáticas, neurotransmisores del sistema nervioso autónomo, entre otras). La glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos favorecen la secreción de insulina, al igual que la activación del receptor β_2 -adrenérgico y la estimulación del nervio vago, mientras que los receptores α_2 -adrenérgicos inhiben la liberación de insulina (**Olvera, Amador y Hernandez 2008**).

La despolarización de la célula β provoca la liberación de insulina; el proceso inicia con el aumento de la concentración plasmática de carbohidratos: la fructosa y la glucosa ingresan en la célula β a través del transporte facilitado mediado por el transportador de glucosa 2 (Glut-2). Glut-2 es un transportador de glucosa con baja afinidad, se expresa en el hígado, riñón, células β del páncreas y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado. Glut-2 participa en la regulación de la secreción de insulina: sólo permite el transporte de glucosa cuando la concentración plasmática



alcanza el umbral de afinidad como sustrato de Glut-2 (>70mg/dL), y en respuesta conduce a la liberación de la cantidad requerida de insulina para mantener la concentración de glucosa. Después de la ingesta de alimento, el hígado, incorpora la glucosa a través del Glut-2 para convertirla rápidamente en glucógeno. De forma inversa, durante el período postprandial tardío (período comprendido entre 6 y 8 horas de ayuno), el glucógeno es degradado para generar moléculas de glucosa, que salen de la célula hepática a la circulación sistémica, preservando de esta manera la glucemia en valores fisiológicos; por lo anterior, Glut-2 es un transportador bidireccional que puede transportar glucosa desde la sangre al tejido o desde el tejido hacia la sangre, según se requiera. Por otro lado, Glut-5 es un transportador específico para fructosa que se expresa en las células del borde en cepillo del intestino delgado, donde modula la absorción de fructosa desde el lumen a la célula epitelial intestinal, pero no transporta a la glucosa **(Olvera, Amador y Hernandez 2008)**.

Tras el ingreso de la glucosa (o fructosa) al interior de la célula β mediante el Glut-2, el carbohidrato es fosforilado (glucosa-6-fosfato, G6-P) por la glucocinasa; este proceso determina la velocidad de glucólisis y de los subsecuentes procesos oxidativos, que culminan con el incremento en la relación ATP/ADP del citosol. Finalmente, la despolarización de la célula ocurre a causa del cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (KATP), incrementando el potencial de membrana hasta alcanzar la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. La entrada de Ca^{2+} al citosol induce la fusión de la vesícula exocítica que contiene insulina con la membrana plasmática. El canal KATP es un octámero compuesto de cuatro subunidades Kir 6.2 y cuatro SUR1; ambos tipos de subunidades tienen dominios de unión a nucleótidos. La subunidad Kir 6.2 se encarga de la respuesta inhibitoria inducida por la unión con ATP. La subunidad SUR1 tiene sitios de unión para el ADP y el diazóxido (que favorecen la apertura del canal), así como para las sulfonilureas y meglitinida (ambas inhiben la apertura canal); por lo tanto, algunas mutaciones en las subunidades alteran la liberación de insulina. Las proteínas cinasa C y A (PKC y PKA, respectivamente) fosforilan proteínas que promueven la exocitosis de insulina; además, pueden fosforilar al canal KATP, facilitando su cierre **(Cervantes y Jose 2013)**.



Regulación en el transporte de glucosa

El receptor de insulina (Figura 2) está presente en todas las células de los mamíferos, tiene actividad tirosinacinasasa intrínseca y está conformado por dos subunidades α y dos β . Las subunidades α son extracelulares y tienen el sitio de unión a ligando, mientras que las subunidades β son hidrofóbicas y atraviesan la membrana, tienen un dominio con varios residuos de tirosina, un dominio tirosinacinasasa y un sitio de unión a ATP (Cervantes y Jose 2013).

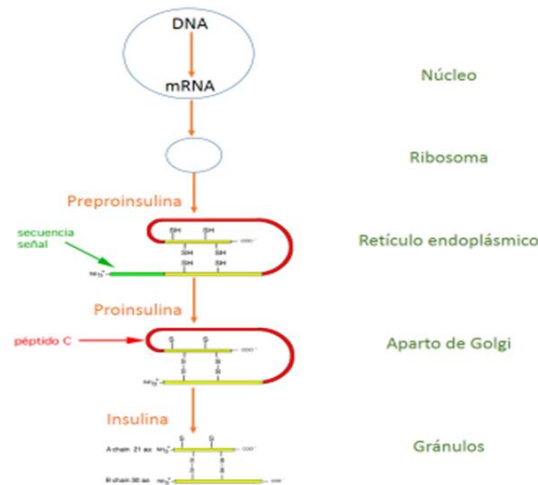


Figura 2. Síntesis de la insulina

El primer compuesto es la "pre-proinsulina", que es transportada al retículo endoplásmico, en donde se pliega espacialmente y donde ocurre una sulfooxidación dando lugar a 2 puentes disulfuro en la molécula, generándose de esta forma la "proinsulina". Luego, en el Aparato de Golgi, se estructura una membrana alrededor de un número determinado de moléculas, constituyéndose un gránulo que, bajo la acción de enzimas proteolíticas, se divide en dos o más partes, dando lugar como producto final a la insulina y péptido C, este proceso no se completa totalmente quedando un pequeño porcentaje de proinsulina. Modificado de Quintero, 2017.

Cuando se une la insulina al receptor, la subunidad α influye en la β para activar la tirosinacinasasa, se autofosforila en residuos de tirosina, y esto inicia la actividad de cinasa sobre otras proteínas como los sustratos del receptor de insulina (IRS-1 a 4), que junto con la proteína Shc participan como proteínas de andamiaje para otras. El receptor de insulina se internaliza inmediatamente después de la unión con insulina, lo que puede llevar a su degradación o reciclaje. La actividad de la tirosinacinasasa disminuye por el AMPc o la fosforilación de residuos de serina/ treonina en la subunidad β ; con frecuencia, la PKC y la PKA fosforilan los residuos serina/treonina del receptor para finalizar la señalización, pero esta fosforilación puede producir insulinoresistencia (RI), inducida por la secreción excesiva de catecolaminas en situaciones adversas; además,



las diversas cinasas serina/treonina también fosforilan los IRSs como mecanismo de retroalimentación negativa del receptor a insulina **(Cervantes y Jose 2013)**.

Los IRS son moléculas que participan en la señalización de insulina para el crecimiento, supervivencia y metabolismo. El IRS-1 y -2 inducen la translocación de Glut-1 y Glut-4 a la membrana celular; el IRS-3 y -4 actúan de manera negativa en la señalización del receptor IGF-1 por supresión del IRS-1 y -2. Estudios sugieren que el IRS-1 incrementa la secreción de insulina inducida por glucosa y sulfonilureas en las células β . Los IRS pueden activar a la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), enzima que fosforila fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para producir fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), como segundo mensajero para activar diferentes proteínas como la proteína cinasa B (PKB/Akt), la cual, dentro de sus funciones, activa factores de transcripción, activa la sintasa de glucógeno y participa en la antilipólisis; la PKB participa en la translocación de Glut-4- (Cervantes y Jose 2013).

Resistencia a la insulina

Diabetes

De acuerdo con la *American Diabetes Association (ADA)*, la diabetes es un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la hiperglucemia crónica resultante de los defectos de la secreción o la acción de la insulina, o ambas **(American Diabetes Association 2018)**. La diabetes suele estar acompañada de una inadecuada secreción de insulina, resistencia de los tejidos a la acción de esta o bien una combinación de ambas; además de presentar una progresión gradual de estas alteraciones, teniendo como consecuencia la completa pérdida de la secreción de insulina y/o actividad de las células β pancreáticas.

Varias organizaciones médicas han planteado criterios para el diagnóstico de la diabetes. El criterio de la ADA incluye síntomas de diabetes (como poliuria, polidipsia y pérdida de peso no explicada) y una concentración de glucosa en plasma por encima de los niveles normales. **(American Diabetes Association 2018)**.

En su etapa inicial la diabetes no produce síntomas, por lo cual se detecta tardíamente; adicional a esto un tratamiento inadecuado podría ocasionar complicaciones de salud



graves (Figura 3), tales como neuropatías, cardiopatías, retinopatías, nefropatías, amputación de las extremidades inferiores y otras afecciones, que limitan la calidad de vida o que significan incapacidad para quienes la viven, y también puede causar muerte prematura (**Chavéz Silva 2019**).

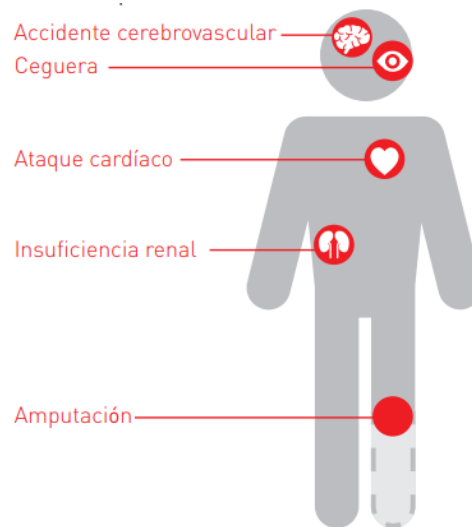


Figura 3. Complicaciones de la diabetes

La diabetes puede provocar complicaciones en muchas partes del cuerpo e incrementar el riesgo de muerte prematura, tomado de (Organización Mundial de la Salud 2016).

Clasificación de la diabetes

Actualmente, la clasificación se establece en cuatro tipos de diabetes según sus causas de acuerdo a la ADA.

Principales tipos de diabetes



DIABETES DE TIPO 1

El cuerpo no produce suficiente insulina



OTROS TIPOS DE DIABETES



DIABETES DE TIPO 2

El cuerpo produce insulina pero no la utiliza apropiadamente



DIABETES GESTACIONAL

Una condición temporal durante el embarazo

Figura 4. Clasificación de la Diabetes, según la ADA.



Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 (DT1) está causada por una reacción autoinmunitaria, en la que el sistema inmunitario del organismo ataca a las células β del páncreas, que producen insulina. Como consecuencia, el cuerpo no produce insulina o la cantidad que produce no es suficiente. Aunque no se entienden totalmente las causas de este proceso destructivo, una explicación probable es que la reacción autoinmunitaria se origine a raíz de la combinación de una sensibilidad genética (que se atribuye a una gran cantidad de genes) y un desencadenante ambiental, como una infección vírica. También se ha implicado a algunas toxinas o factores alimenticios. La afección puede aparecer a cualquier edad, aunque la DT1 ocurre con más frecuencia en niños y en jóvenes. La DT1 es una de las enfermedades crónicas más comunes en la infancia. Las personas con DT1 necesitan insulina para mantener la glucemia dentro de los valores apropiados; sin ella, no sobrevivirían. No obstante, con el tratamiento apropiado de insulina diaria, un control regular de la glucemia, educación y apoyo, pueden llevar vidas saludables y retrasar o prevenir muchas de las complicaciones que se asocian con la diabetes **(Federación Internacional de la Diabetes 2019)**.

Hiper glucemia en el embarazo

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, la hiper glucemia en el embarazo se clasifica como diabetes gestacional (DG) o diabetes en el embarazo (DE). La DG se diagnostica por primera vez durante el embarazo y puede ocurrir en cualquier momento de este período (con más frecuencia después de la semana 24). La DE se refiere a las embarazadas previamente diagnosticadas con diabetes o que padecen hiper glucemia diagnosticada por primera vez durante el embarazo, y que cumple con los criterios de la OMS sobre la diabetes durante el período de no embarazo. Además, la DE puede ocurrir en cualquier momento del embarazo, incluido el primer trimestre. Se calcula que la mayoría de los casos de hiper glucemia en el embarazo (75 - 90 %) son DG (Federación Internacional de la Diabetes 2019).



Otros tipos de diabetes

El informe recientemente publicado por la OMS sobre la clasificación de la diabetes enumera “otros tipos específicos” (de diabetes), incluida la diabetes monogénica y lo que antes se denominaba “diabetes secundaria”. La diabetes monogénica, como su nombre indica, se origina a partir de un solo gen en lugar de contribuciones de múltiples genes y de factores ambientales, como es el caso de la DT 1 y DT2. Este tipo es mucho menos común y se estima que representa entre el 1.5 % y el 2 % de los casos de diabetes en todo el mundo, aunque este valor puede estar por debajo del real. Estos tipos monogénicos presentan un amplio espectro, desde diabetes neonatal (denominada a veces “diabetes monogénica infantil”), diabetes tipo MODY (diabetes juvenil de inicio en la madurez) y diabetes poco frecuente asociada con enfermedades sindrómicas. De acuerdo con la última clasificación de diabetes de la OMS, se enumeran a continuación otros tipos específicos de esta enfermedad:

- Diabetes originada por enfermedades del páncreas exocrino, como pancreatitis, traumatismo pancreático, infección pancreática, cáncer de páncreas y pancreatometomía.
- Diabetes debida a trastornos endocrinos que producen secreción excesiva de las hormonas que antagonizan la insulina.
- Diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas que pueden detener la secreción o la acción de la insulina.
- Diabetes producida por una infección vírica asociada con la destrucción de las células β .

Diabetes tipo 2

En principio, la hiperglucemia en la DT2 es el resultado de la incapacidad de las células del cuerpo de responder totalmente a la insulina, lo que se conoce como “resistencia a la insulina” (RI). Durante el estado de RI, la hormona no es eficaz, lo que deriva en un aumento de la producción de insulina. Con el tiempo, se puede llegar a una producción de insulina inadecuada porque las células β pancreáticas no cumplen con la demanda. La DT2 se ve con más frecuencia en adultos mayores, pero se evidencia cada vez más en niños y adultos jóvenes por los niveles crecientes de obesidad, inactividad física y dieta



inapropiada. Este tipo de diabetes puede aparecer con síntomas similares a los de la DT1 pero, en general, la aparición del tipo 2 es mucho menos drástica y es probable que ocurra sin síntomas. Además, suele ser imposible determinar el momento exacto de la aparición de la DT2. Como consecuencia, el período prediagnóstico es a menudo prolongado y es probable que entre un tercio y la mitad de las personas con DT2 no reciban el diagnóstico correspondiente. Cuando no se identifica la enfermedad por un tiempo prolongado, en el momento del diagnóstico pueden estar ya presentes ciertas complicaciones como la retinopatía o úlceras en miembros inferiores que no sanan. Aún no se comprenden totalmente las causas de la DT2, pero existe una estrecha relación con el sobrepeso, la obesidad y la edad madura, así como con el origen étnico y los antecedentes familiares. Como con la DT1, la DT2 se origina a partir de la combinación de una predisposición multigénica y desencadenantes ambientales. La piedra angular del tratamiento de la DT2 es la promoción de un estilo de vida que incluya una dieta sana, actividad física regular, no fumar y el mantenimiento de un peso corporal saludable. Si los intentos de modificar el estilo de vida para controlar la glucemia fallan, se suele comenzar la administración oral de medicamentos con la metformina como el primer recurso. Si el tratamiento con un solo antidiabético no es suficiente, en la actualidad disponemos de una variedad de opciones de tratamiento conjunto (p. ej., sulfonilureas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 [DPP-4], análogos de péptido similar al glucagón tipo 1 [GLP-1]). Cuando la medicación oral no es suficiente para controlar la hiperglucemia según lo recomendado, puede necesitarse de insulina. Más allá del control de la glucemia es fundamental controlar la presión sanguínea y la lipidemia, además de evaluar con regularidad (como mínimo, una vez por año) el control metabólico. Esto permitirá el cribado para detectar la aparición de complicaciones renales, retinopatía, neuropatía, arteriopatía periférica y úlceras en las piernas. Con controles regulares y una gestión eficaz del estilo de vida, así como con la medicación que se necesite, las personas con DT2 pueden vivir mucho tiempo y de manera saludable. A nivel global, la prevalencia es alta y aumenta en todas las regiones. Este aumento se debe al envejecimiento de la población, al desarrollo económico y al incremento de la urbanización, lo que deriva en estilos de vida más sedentarios e incremento en el consumo de alimentos poco saludables, que se relacionan con la



obesidad. Sin embargo, los resultados benéficos de la detección temprana, los tratamientos más eficaces y la consecuente supervivencia prolongada también contribuyen al aumento de la prevalencia (**Federación Internacional de la Diabetes 2019**)

La DT2 es el tipo más común de diabetes y representa el 90 % de los casos de diabetes en todo el mundo.

Debido a la alta prevalencia de la DT2, en este proyecto nos enfocaremos en este tipo de diabetes.

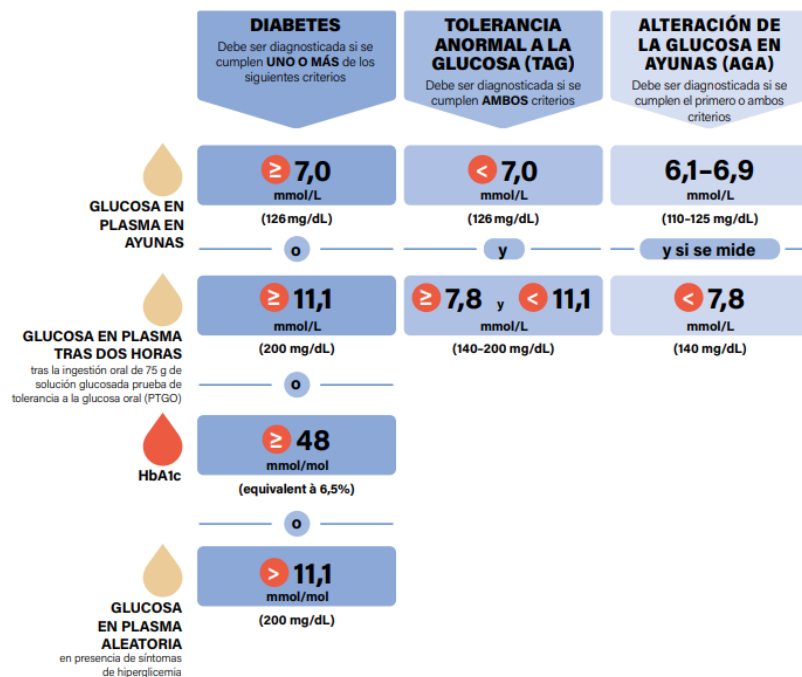


Figura 5. Criterios de diagnóstico modificados para la diabetes

El ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 horas. La prueba de HbA1c se debe realizar en un laboratorio que aplique el método certificado por el NGSP y estandarizado para el Ensayo sobre el control y las complicaciones de la diabetes. El examen de glucosa posprandial de dos horas se debe realizar con una solución glucosada que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua

Diagnóstico de la Diabetes tipo 2

La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a ella conduce a hiperglucemia, indicador clínico de la diabetes. La ADA recomienda diagnosticar la “prediabetes” con valores de HbA1c que varíen entre 39 y 47 mmol/mol (5.7-6.4 %) y la alteración de la glucosa en ayunas cuando oscile entre 6.1 y 6.9 mmol/l (110-125 mg/dl), el umbral para el diagnóstico de la diabetes se observa en la Figura 5 (**Federación Internacional de la Diabetes 2019**).

Estadísticas en México y en el mundo

Según el instituto Nacional de Estadística y Geografía, en México la diabetes es la segunda causa de muerte, durante el 2015, fallecieron 98,521 personas por este padecimiento.

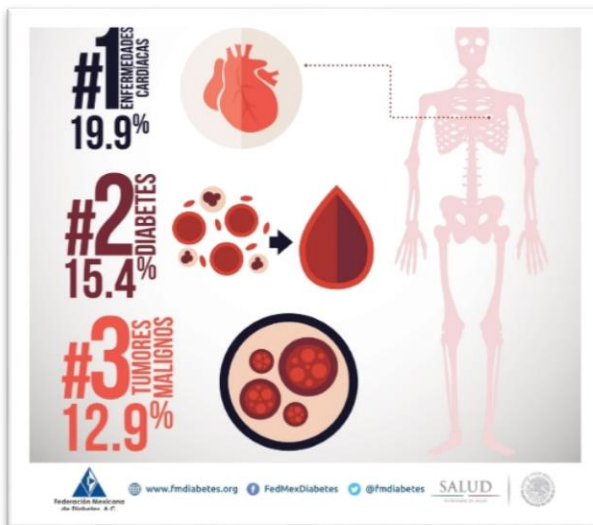


Figura 7. Principales causas de muerte en México
 La diabetes ocupa el 2° lugar en muertes en México.
 Fuente: INEGI 2018

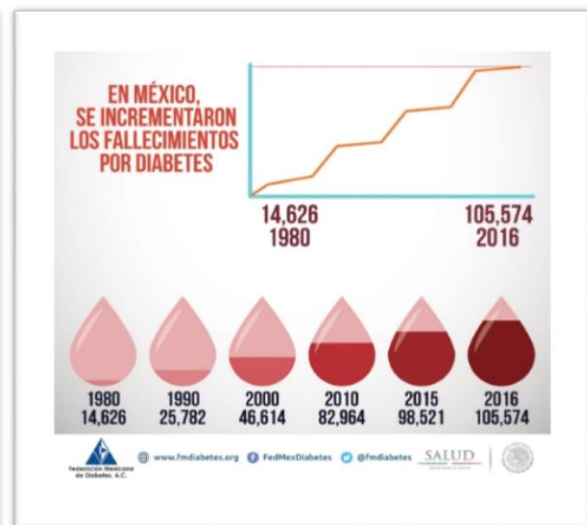


Figura 6 estadísticas de mortalidad 2018
 Fuente: INEGI, estadísticas 2018.

La diabetes es una condición de salud importante, 25 % de personas mayores de 65 años tienen diabetes y la mitad de adultos mayores tiene prediabetes, y se espera que esta



proporción aumenta rápidamente con el paso del tiempo (**American Diabetes Association, 2018**).

Además de suponer una gran carga económica para los individuos y sus familias debido a los altos costos de los medicamentos esenciales, la diabetes también tiene un impacto económico sustancial para los países y los sistemas sanitarios nacionales. Esto es debido a un mayor uso de los servicios de salud, pérdida de productividad y el apoyo a largo plazo necesario para superar las complicaciones relacionadas con la diabetes, tales como las enfermedades renales, ceguera y problemas cardíacos. La mayoría de los países gastan entre 5% y 20% del total del gasto sanitario en diabetes. Con tal gasto, la enfermedad supone un desafío significativo para los sistemas sanitarios y un obstáculo para el desarrollo económico sostenible (**Federación Internacional de la Diabetes 2019**).

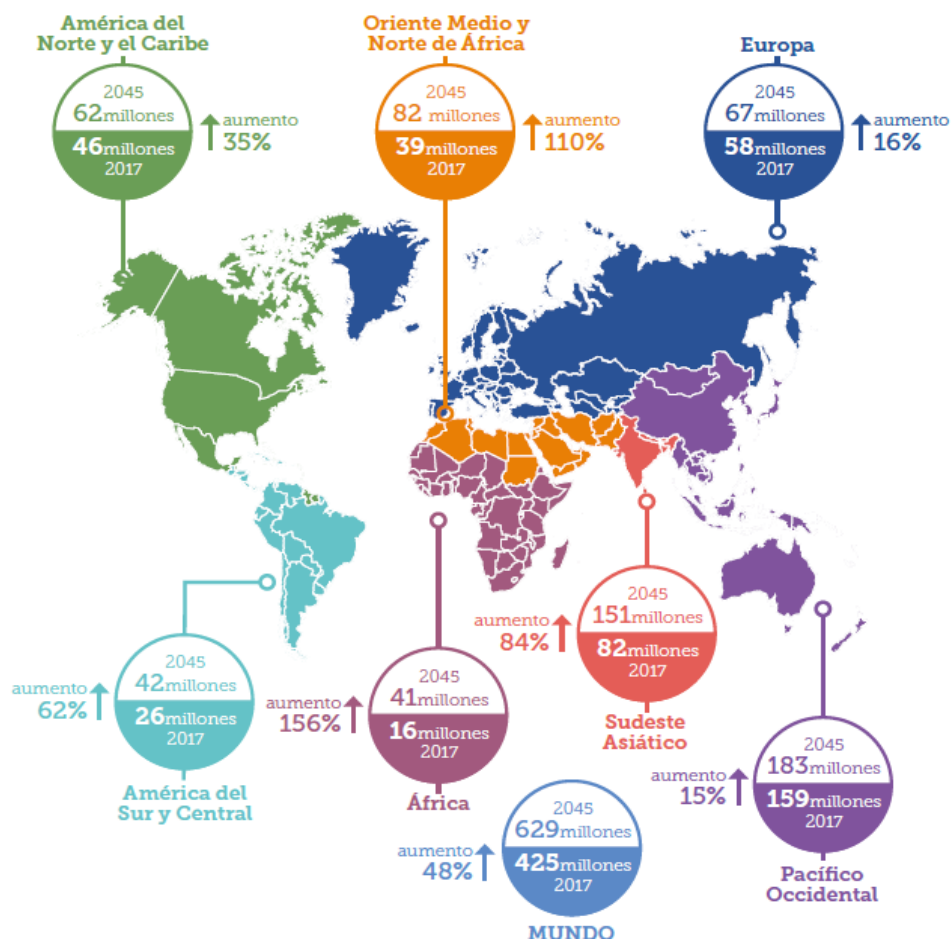


Figura 8. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2017 y 2040 (20-79 años). Obtenido de Federación Internacional de la Diabetes 2019.



Opciones terapéuticas para el tratamiento de la Diabetes tipo 2

Los numerosos avances en el campo de la diabetes junto a la aportación de la información de estudios clínicos extensos, en número de sujetos y en tiempo, han modificado sustancialmente el abordaje y el tratamiento de la hiperglucemia en el paciente. Así, los nuevos conocimientos de la fisiopatología de la DT2 han permitido clarificar más los mecanismos fisiológicos de regulación del metabolismo de la glucosa.

En la figura 7 se describe el lugar de acción de los “hipoglucemiantes orales clásicos” dirigidos básicamente a disminuir la absorción de los hidratos de carbono (inhibidores de las α -glucosidasas [I α G]), vencer la RI (biguanidas y tiazolidindionas [TZD]), disminuir la producción hepática de glucosa (biguanidas y TZD) o incrementar la secreción de insulina (sulfonilureas [SU] y meglitinidas, insulina) (Barrera 2014).

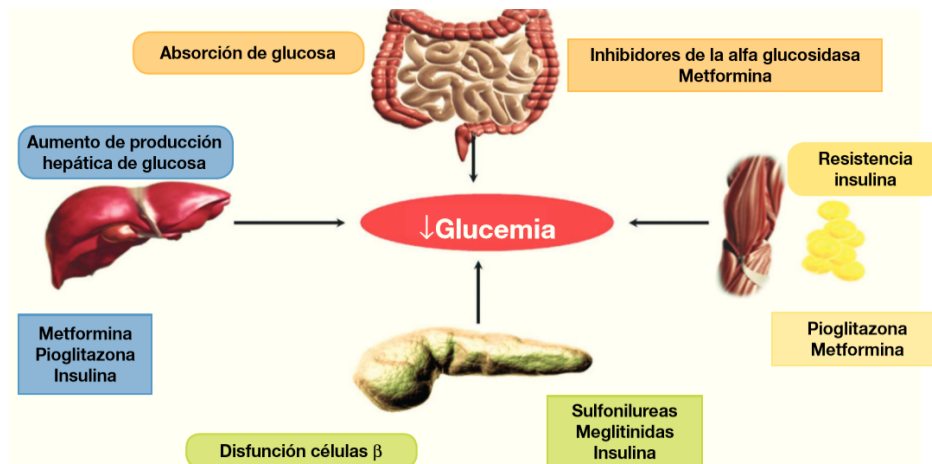


Figura 8. Lugar de acción de los hipoglucemiantes clásicos. Modificada (Barrera 2014)

Sin embargo, en algunos casos, dada la no adherencia de los pacientes al tratamiento (no farmacológico y farmacológico) y/o bien a la progresión de la enfermedad, es necesario recurrir a terapias donde se combinan dos o más de los fármacos antidiabéticos disponibles actualmente (Tabla 1). Cuando los medicamentos antidiabéticos orales no controlan la hiperglicemia, se suele recurrir a la insulina (Chavéz Silva 2019).



Tabla 1. Antidiabéticos orales, modificado de Chaudhury et al. 2017.

Clase	Medicamento	Mecanismo de acción	Riesgo de hipoglucemia	Efectos secundarios
Inhibidores de Dipeptil peptidasa 4 (DPP-4)	Sitagliptina	Inhibe la actividad de DPP-4 y aumenta las concentraciones de incretina postprandial, aumenta la secreción de insulina, disminuye la secreción de glucagón	Bajo	En ≥ 5 % de los pacientes infección del tracto infeccioso del tracto urinario respiratorio, y cefalea
Agonistas de GLP-1	Liraglutida	Activa el receptor GLP-1, aumenta la secreción de insulina dependiente de glucosa, disminuye la producción de glucagón, retrasa el vaciamiento gástrico	En combinación con sulfonilureas	Pérdida de peso
Sulfonilureas	Glibenclamida	Secreción de insulina por bloqueo de canales de K^+ dependientes de ATP	Contraindicado en personas con daño renal	Aumento de peso, estimulación de adipogénesis



Inhibidores de cotransportador de Glucosa y Na (SGLT-2)	Canaglifozina	Bloqueo de la reabsorción (90%) renal de glucosa; mecanismo de acción independiente de la insulina	Bajo	En 5% de los pacientes infecciones micóticas genitales, infección del tracto urinario y aumento de la micción.
Biguanidas	Metformina	Insulinosensibilizador, inhibe la producción hepática de glucosa, mediante la activación de AMP-cinasa	Ninguno	Pérdida leve de peso debido al efecto anorexígeno
Inhibidores de α-glucosidasas	Acarbosa	Inhibición parcial de la hidrólisis de disacáridos por lo que retarda la absorción postprandial de monosacáridos	Alto	
Meglitidinas	Repaglinida	Bloqueo de los canales de K^+ dependientes de ATP		
Tiazolidindionas	Pioglitazona	Activación de PPAR- γ , aumenta la sensibilidad a la insulina	Bajo	Aumento de peso

Efectos y mecanismos en la sensibilización de la insulina

Si bien existen terapias novedosas para el tratamiento de la diabetes, aun es necesario desarrollar agentes antidiabéticos que actúen sobre novedosos blancos terapéuticos, que hagan más eficiente el tratamiento de la DT2. Actualmente existen varios blancos terapéuticos dirigidos, en primer lugar, a reducir la producción excesiva de glucosa en el hígado; en segundo lugar, los mecanismos para aumentar la secreción de insulina estimulada por la glucosa; los nuevos enfoques de la obesidad y el metabolismo lipídico



alterado, que ofrecen la posibilidad de mejoras en la acción de la insulina (o su secreción). De esta manera, la activación de receptores nucleares como reguladores de la expresión de enzimas que regulan el metabolismo (por ejemplo PPAR- γ), favorecen la sensibilidad a la insulina y tolerancia de ácidos grasos y glucosa (Juarez 2017).

Los PPAR's son factores de transcripción regulados por ligandos, principalmente ácidos grasos, que controlan la expresión génica uniéndose a elementos de respuesta específicos (PPRE). Los PPAR's se unen como heterodímeros con un el factor de retinoide X (RXR) y tras esta unión al agonista de unión se incrementa la velocidad de iniciación de la transcripción de los genes regulados por la isoforma específica de PPAR (Berger and Moller 2002).

PPAR- γ es necesario para diferenciar a los adipocitos. Se mostró que interactúa con el elemento *cis* que regula la expresión específica de los adipocitos de la proteína de unión a ácidos grasos aP2. PPAR- γ también regula los genes que controlan la homeóstasis de la energía celular. Se ha demostrado que aumenta la expresión de las proteínas de desacoplamiento mitocondrial, UCP-1, UCP-2 Y UCP-3 *in vitro* e *in vivo* (Gao et al. 2016).

Los PPAR- γ desempeñan una función fisiológica crítica como sensores y reguladores del metabolismo de los lípidos. Los ácidos grasos y eicosanoides han sido identificados como ligandos naturales para los PPAR- γ . Los ligandos de PPAR- γ sintéticos más potentes, incluye a las tiazolidindionas, estos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de dislipidemias y la diabetes. El uso de tales ligandos ha permitido a los investigadores develar funciones potenciales para los PPAR- γ en estados patológicos, como la diabetes (Berger and Moller 2002).

Medicina tradicional Mexicana

Las plantas medicinales son un campo muy amplio para el estudio y descubrimiento de compuestos activos, en este sentido, la medicina tradicional se ha utilizado desde hace miles de años y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, ya que los productos naturales a menudo tienen acciones biológicas importantes debido a afinidades de unión para proteínas específicas, relevantes para sus funciones biológicas (REF).

En la actualidad, los medicamentos orales para tratar padecimientos como la diabetes poseen varios efectos adversos, ya que al ser tratamientos crónicos se puede crear tolerancia, es por ello la búsqueda continua de moléculas que tengan potencial actividad terapéutica frente a esta y otras enfermedades, y que, adicionalmente, muestren pocos efectos adversos.

En esta investigación se buscó establecer el potencial farmacológico de la especie vegetal *Plantago australis*, debido a su aplicación en la medicina tradicional como tratamiento complementario para la DT2.

Adicionalmente, estudios previos en el grupo de trabajo de Estrada-Soto han demostrado eficacia farmacológica de *Plantago australis* (Ornelas Mendoza 2018, Chavéz Silva 2019).

Plantago australis Lam.

Plantago australis Lam., conocida como “gusanillo” es una planta perenne de la familia Plantaginaceae. *P. australis* es una planta herbácea originaria de Argentina, alcanza hasta 40 cm de altura con hojas angostas, de color verde pálido y miden hasta 26 cm de largo que crecen en la base de la planta. Las flores son de color café y están agrupadas en espigas (Figura 9) (Ornelas Mendoza 2018).

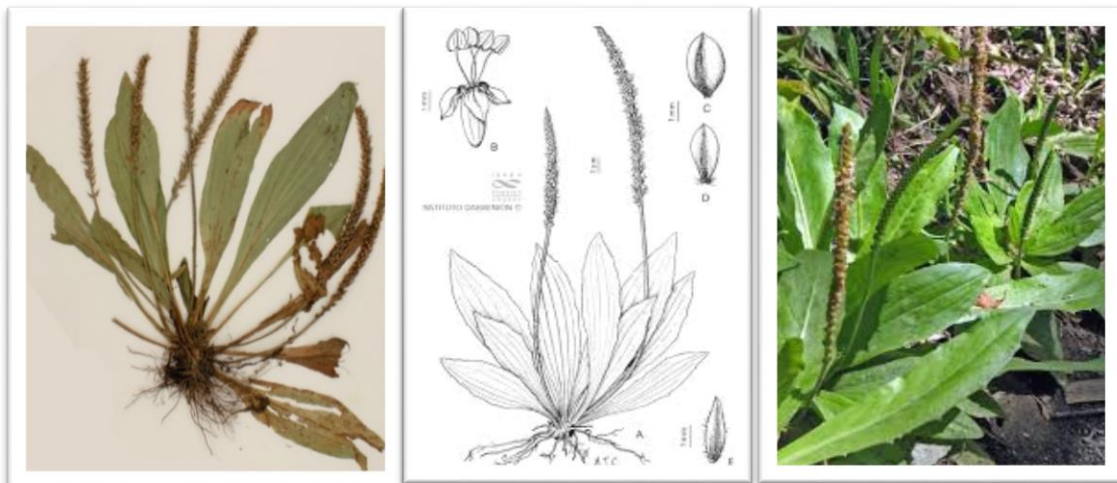


Figura 9. *Plantago australis* Lam. (Tomado de (Instituto de botánica Darwinion s.f.))



Etnobotánica y antecedentes etnomédicos

Plantago australis en la medicina tradicional suele emplearse como laxante, diurético, antiinflamatorio, antibacterial y cicatrizante. En México, se usa para trastornos en el aparato digestivo, como tratamiento para la inflamación de riñones, como tratamiento complementario para la diabetes y trastornos relacionados con esta enfermedad (Ornelas Mendoza 2018).

Evidencia científica de *Plantago australis* Lam.

Algunos estudios fitoquímicos han demostrado que varios de los metabolitos secundarios de *P. australis* incluyen compuestos fenólicos, como el verbascósido. Estructuralmente este compuesto está conformado por: ácido cafeico, 4,5-hidroxifeniletanol unido a β -(D)-glucopiranosido, una agrupación ramnosa y una molécula de glucosa (Moura-Sperotto y otros, 2018). Las hojas de *P. australis* contienen plantanósido y verbascósido, en la semilla y en la planta completa se ha reportado el monoterpeno auncubósido (Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009). Por otro lado, en cuanto a las actividades farmacológicas reportadas para esta especie, destacan el potencial analgésico y anti-inflamatorio de extractos etanólicos de hojas, raíces y frutos (Palmeiro, y otros 2002). Otros estudios también demostraron que un extracto hidroalcohólico estandarizado de *P. australis* (verbascósido, 6%) posee propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes (Moura-Sperotto y otros, 2018). Por otro lado, hay estudios sobre las propiedades antiinflamatorias y analgésicas del extracto hidroalcohólico de *P. australis* (Palmeiro, y otros 2002), así como un estudio de toxicidad subcrónica (60 días) a dosis de 850 y 1,700 mg/kg. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan establecer, de manera más precisa, la toxicidad de *P. australis* (Palmiero, y otros 2003).

Adicionalmente, estudios por Ornelas-Mendoza (2018) del grupo de trabajo de Estrada-Soto, demostraron que el EHAPa (100, 160 y 330 mg/kg) disminuyó de manera significativa el pico hiperglucémicos en CTG en ratones normoglucémicos; así como, el porcentaje de variación de la glucosa en el modelo de DENID, sugiriendo la participación de mecanismos insulinosensibilizadores. Por otro lado, ~~se realizaron~~ los ensayos de toxicidad aguda (5, 50, 300 y 2,000 mg/kg) y toxicidad subcrónica (28 días, 100 mg/kg),



los ~~cuales~~ no mostraron evidencias de procesos toxicológicos aparentes (**Ornelas Mendoza 2018**).

Los resultados encontrados por Ornelas-Mendoza (2018) y Chávez-Silva (2019), así como los escasos estudios sobre *Plantago australis*, dieron pauta para elegir a esta especie vegetal para su estudio antidiabético y explorar algunos de los posibles mecanismos de acción implicados.



JUSTIFICACIÓN



La diabetes es un importante problema de salud pública en México y en el mundo. Actualmente, existen 415 millones de adultos con diabetes y 318 millones de adultos con tolerancia a la glucosa alterada, lo que les sitúa con alto riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro; además, este padecimiento frecuentemente conduce a complicaciones crónicas y cierta tolerancia a los medicamentos, debido al tiempo prolongado de la exposición al mismo fármaco y al bajo apego al tratamiento por parte de los pacientes (**American Diabetes Association 2018**).

Por otro lado, los efectos adversos al paciente se hacen presentes, ya que los cambios fisiopatológicos asociados a esta enfermedad se tornan de manera progresiva, por lo que es necesario recurrir a una gran cantidad de fármacos que actúen de manera específica sobre esas complicaciones. Dado que existe la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas que actúen sobre blancos específicos, mejorar la sensibilidad a la insulina, y promover la expresión de genes relacionados a su buen funcionamiento, entre otros. Es por ello la importancia de este trabajo, que estudió el efecto antidiabético subagudo del EHAPa; además, el estudio fitoquímico preliminar permite la identificación de alguno de los compuestos responsables del efecto antidiabético, que podrían ser prototipos y/o potenciales fármacos que brinden mejores resultados y menos reacciones adversas en ese padecimiento.



HIPÓTESIS



Con base en los antecedentes, *Plantago australis* mostrará un efecto antidiabético subagudo en un modelo murino, así mismo se identificará(n) y cuantificará(n) el(los) compuesto(s) responsable(s) de su actividad antidiabética.



OBJETIVOS



Objetivo general

Evaluar el efecto antidiabético agudo y subagudo del EHAPa *in vivo*, así como determinar su perfil fitoquímico preliminar para encontrar alguno de los compuestos responsables de su efecto antidiabético.

Objetivos específicos

- Determinar el potencial antihiper glucémico *in vivo* del EHAPa.
- Establecer la eficacia antidiabética aguda y subaguda del EHAPa sobre un modelo murino de diabetes experimental no insulino dependiente.
- Analizar los perfiles bioquímicos y la expresión de genes (ARN mensajero) en los animales tratados con el EHAPa durante 15 días.
- Identificar y cuantificar algunos de los compuestos bioactivos del EHAPa responsables del efecto antidiabético.



METODOLOGÍA



Obtención del material vegetal

Plantago australis Lam subsp fue recolectada e identificada taxonómicamente por la Dra. Irene Perea Arango, del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con número de Voucher 34059. Para el desarrollo de los siguientes estudios se utilizó toda la planta.

Obtención del extracto hidroalcohólico

P. australis fue recolectada en el estado de Morelos durante los meses de julio-agosto, posteriormente, fue secada a la sombra y a temperatura ambiente, obteniendo 250 g de materia vegetal seco. Este, una vez molido se sometió a maceración exhaustiva durante 72 horas (por triplicado) con una mezcla de etanol (70 %) / agua (30 %). Una vez transcurrido ese tiempo, el disolvente se eliminó con ayuda de un rotaevaporador a presión reducida, obteniendo una resina color marrón con un rendimiento de 17 %.

Estudio fitoquímico preliminar: identificación y cuantificación de Ácido Ursólico (AU) por método de HPLC

Para aislar los compuestos responsables de la actividad farmacológica del extracto, se hizo la extracción y separación líquido-líquido (Agua-Acetato de etilo).

Para determinar el UA en HAEPa, se disolvió una muestra de extracto (1.1 g) en agua (4 ml) y se extrajo sucesivamente (3 veces) con acetato de etilo (4 ml cada una). Posteriormente, la fase orgánica se concentró para obtener 0.11 g de una mezcla sólida amarilla (EAcE), donde se identificó el UA comparándolo con el estándar por cromatografía de capa fina. Luego, decidimos identificar y cuantificar UA por HPLC (Waters modelo 2456), donde la fase móvil de metanol / agua acidificada fue en proporción de 85:15, utilizando una columna Gemini (4.6x75 mm), con flujo de 0.9 ml / min, y detección UV / Vis (Waters 2456) para la muestra de prueba a 250 nm. Se inyectó el estándar comercial de AU (Sigma-Aldrich, ≥ 97 %) para identificar el tiempo de retención del pico, por triplicado en solución con concentración conocida. Además, el UA contenido en HAEPa y EAcE se cuantificó comparando con curva de calibración. Se inyectaron siete concentraciones del estándar de UA y se determinó el área bajo la curva de los picos obtenidos en cada inyección. Así, se obtuvo la ecuación lineal que genera r^2 de 0.99 (Vergara Martínez, y otros 2018).



Uso y manejo de los animales de experimentación

Los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio con ciclos de 12 h luz/oscuridad, y fueron alimentados *ad libitum*. Los animales de experimentación se manipularon conforme a la Regulación Federal para el Manejo y experimentación de Animales, emitida por la secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Los procedimientos están descritos en la NOM-062-ZOO-1999. Este protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética **(Ornelas Mendoza 2018)**.

Determinación antihiper glucémica del EHAPa

Con el fin de determinar el potencial antihiper glucémico del EHAPa, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa en ratas normoglucémicas con ayuno de 16 horas; las ratas fueron pesadas y se formaron 5 grupos (n=6 por grupo). Dos grupos fueron de prueba, al primer grupo se le administró 100 mg/kg del EHAPa, al segundo grupo 100 mg/kg del EAcE, el grupo control positivo fue administrado con glibenclamida (10 mg/kg) y los grupos controles negativos fueron administrados con vehículos agua y Tween 80 al 10 %, respectivamente, previo a la administración de cada muestra se determinó la glucemia (G0), y 30 minutos después se les administró una carga de glucosa (2 g/kg), posteriormente, se monitorearon las glucemias a 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas para generar la gráfica y análisis de datos correspondiente **(Ornelas Mendoza 2018)**.

Inducción a la diabetes experimental no insulino dependiente

La diabetes se indujo en ratas macho Wistar (250-300g) con de 16 horas de ayuno **(Chavéz Silva 2019)**, por administración intraperitoneal de 110 mg/kg de Nicotinamida (ND) disuelta en solución salina, y después de 15 minutos, se administró 65 mg/kg de Estreptozotocina (STZ), disuelta en un amortiguador frío de citratos a pH 4 **(Montalbal 2015)**. 15 días posteriores a la diabetización se determinó la glucemia en ayuno y se comprobó el modelo de diabetes experimental no insulino dependiente.

Determinación de la actividad antidiabética aguda

Para las evaluaciones antidiabéticas se emplearon las ratas diabetizadas con glucemias mayores a 150 mg/dL. Las ratas fueron privadas de alimento durante 13 horas, con libre



acceso al agua. El peso corporal y las glucemias se determinaron al inicio del experimento. Se formaron 6 grupos de animales (n=6 por grupo), 2 fueron los grupos de prueba, al primer grupo se administró 100 mg/kg del EHAPa, al segundo grupo se administró 100 mg/kg de EAcE. Se emplearon tres grupos control positivo: uno con glibenclamida (10 mg/kg), otro con pioglitazona (30 mg/kg), y el último con AU comercial Sigma Aldrich (50 mg/kg). Los grupos de control negativo fueron administrados con agua y Tween 80 al 10%, respectivamente. Posterior a la administración, se monitorearon las glucemias a los tiempos 1, 3, 5 y 7 h, para generar la gráfica e interpretación de datos (Ornelas Mendoza 2018).

Estudio antidiabético subagudo

Las ratas diabetizadas (glucemia mayor a 150 mg/dL) se dividieron en cuatro grupos de seis animales: el grupo normoglucémico, el grupo vehículo (0.1 mL de agua), el grupo con metformina (200 mg/kg) y el grupo con 100 mg/kg del EHAPa. Los grupos se mantuvieron en condiciones de bioterio con comida y agua *ad libitum*, y fueron tratados con las muestras de prueba y vehículo durante 15 días a una dosis diaria. Las glucemias se determinaron antes de la administración diaria (G0) y después de la administración (G5), durante los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 del tratamiento.

Adicionalmente, durante los días de tratamiento, se monitoreó el peso de los grupos empleados, determinando el incremento o disminución con respecto al peso inicial (Cerón Romero 2016).

Análisis del % de variación de glucemia

Para determinar el efecto del EHAPa sobre la glucemia, los datos de cada tratamiento se analizaron (n=6) y los resultados se transformaron en datos que representan las medias aritméticas con errores estándar, estos datos son exhibidos en gráficas de variación de glucemia vs. tiempo. Los valores de variación de glucemia fueron calculados con la ecuación descrita por Ortiz y otros, 2008.

$$\% \text{ de variación de glucemia} = \left(\frac{\text{Glu } X - \text{Gluc } 0}{\text{Gluc } 0} \right) \times 100$$



En donde el % de variación de glucemia representó la diferencia aritmética entre los promedios de la glucemia al tiempo cero de experimentación (G0) y los promedios de la glucemia a los tiempos evaluados. Se empleó el programa GraphPad Prism v. 5.0 para graficar el porcentaje de variación de glucemia contra el tiempo y el análisis estadístico de varianza de dos vías ($p < 0.05$), con prueba *post-hoc* de Bonferroni.

Análisis del perfil de glucosa y lípidos

Una vez finalizado el ensayo subagudo, se anestesiaron las ratas de cada grupo (normoglucémico, vehículo, metformina y EHAPa) con 100 mg/kg de pentobarbital sódico, vía IP, y por punción cardíaca se extrajo la sangre para determinar los componentes bioquímicos de acuerdo al tratamiento. Después de la extracción de sangre, se colocó en tubos sin anticoagulante, se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 minutos para separar el suero del paquete globular. Obtenidos los sueros, se determinaron glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL (**Cerón Romero 2016**).

Análisis estadístico de datos

Para construir las gráficas se empleó el programa GraphPad Prism v. 5. 0, y para establecer la significancia estadística se hizo análisis de varianza de dos vías, $p < 0.05$, con análisis *post-hoc* de Bonferroni.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Identificación y cuantificación de UA

Durante la concentración del extracto hidroalcohólico, de manera espontánea precipitó un sólido blanco amarillento, que al compararlo por cromatografía capa fina con un estándar se identificó como AU (Ácido Ursólico). Después, y para cuantificar el AU se hizo una extracción con acetato de etilo del extracto hidroalcohólico, y precipitó una resina ámbar, con lo que se identificó cualitativamente el AU, por comparación en cromatografía de capa fina (Fig. 10) con el estándar de AU. Después, se cuantificó AU por HPLC (Fig. 11 y Tabla 2), determinando que 49.6 mg del extracto contienen 0.36 mg de AU (0.73 % de AU/1 g de EHAPa). Por lo que se puede concluir que los triterpenos, como AU, existen en *P. australis* (Henn et al., 2019), compuestos que podrían ser responsables de su efecto antidiabético (Ramírez-Espinosa y otros 2011).

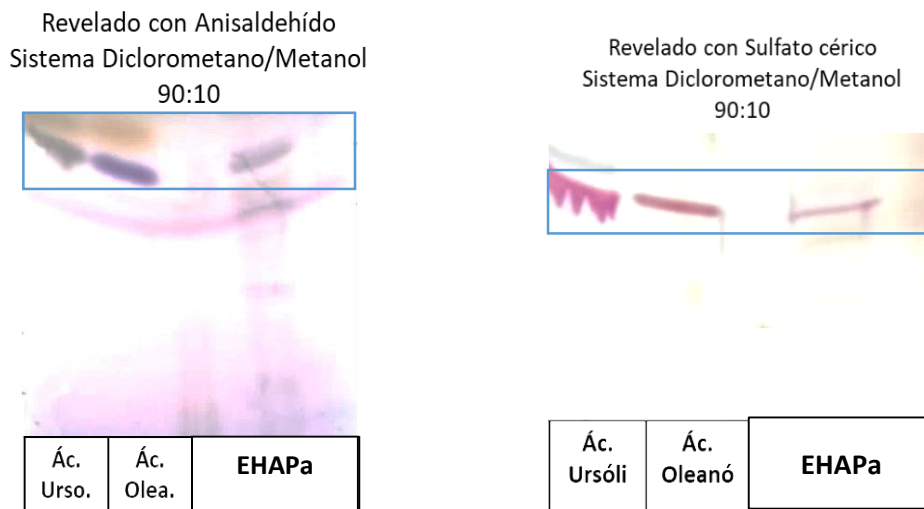


Figura 10. Identificación de AU en el EHAPa por cromatografía en capa fina

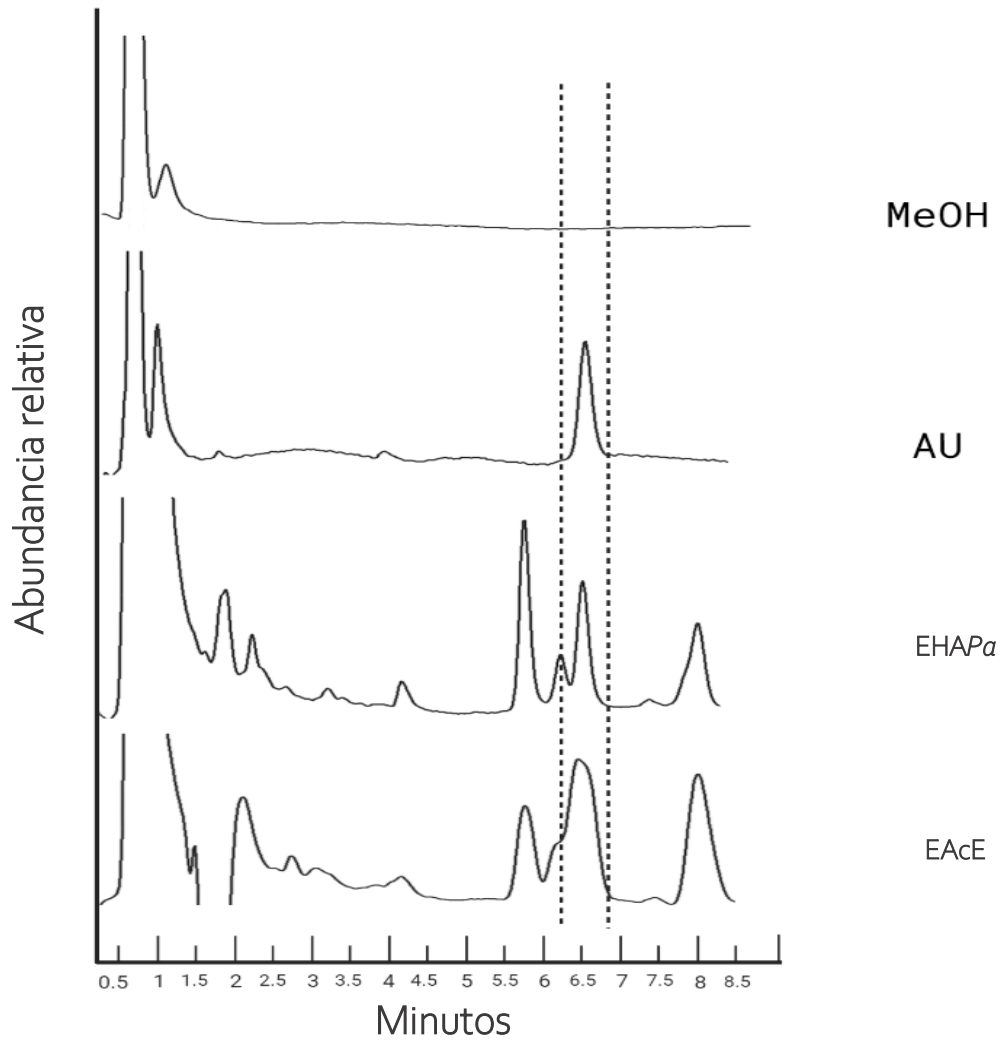


Figura 11. Perfiles de HPLC del ácido ursólico presente en HAEP α y EAcE. Condiciones cromatográficas: columna Gemini (4.6 mm x 75 mm); fase móvil: metanol/agua acidificada 85:15 (v/v), flujo 0.9 ml/min.

Porcentaje de Ácido Ursólico	
EHAP α	EAcE
0.73%	4.0%

Tabla 2. Cuantificación de AU



Determinación antihiper glucémica: Curvas de tolerancia a la glucosa

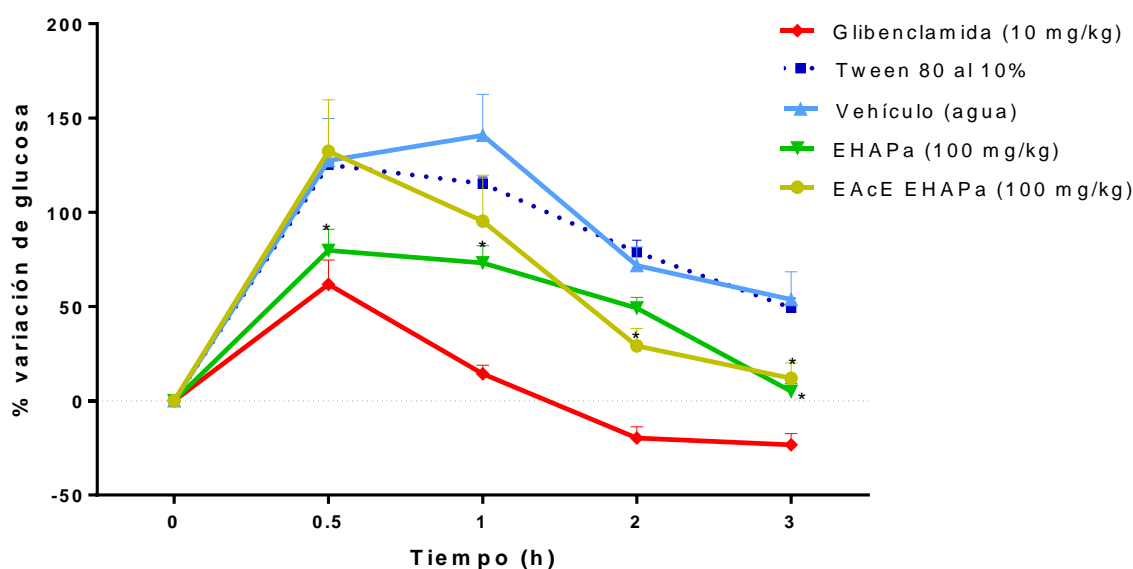
Como se describió en la Introducción, *Plantago australis* es una planta utilizada en la medicina tradicional para tratar complicaciones de la diabetes. Así, en la investigación actual evaluamos el extracto hidroalcohólico para demostrar su actividad antidiabética, ya que no existe ningún informe científico que lo avale.

Se evaluó EHAPa en curvas de tolerancia a glucosa (CTG), para corroborar su uso como agente antihiper glucémico. En la gráfica 1 se observa que EHAPa (100 mg / kg) disminuyó ($p < 0.05$) el pico hiper glucémico producido por la carga de glucosa administrada (2 g / kg), durante todo el experimento (3 horas después del tratamiento); también, el extracto disminuyó el área bajo la curva (ABC) del grupo de animales tratados frente a los animales de control. Estos resultados sugieren que el efecto podría estar relacionado con el bloqueo de los transportadores intestinales de glucosa, como GLUT-2 y SGLT-1. En cambio, la disminución temprana del ABC y el rápido establecimiento de los valores de glucosa de referencia en los animales tratados sugieren una posible acción sensibilizante a la insulina (**Chávez-Silva et al., 2018**).

Por otro lado, el EAcE también disminuyó e significativamente la glucemia a las horas 2 y 3, lo cual concuerda con lo encontrado por HPLC, en donde se determinó la presencia de AU entre los componentes de EAcE, siendo el AU el responsable del efecto. Se ha descrito que el AU posee actividad insulinosensibilizadora al ser agonista de PPAR γ e inhibe algunas interleucinas proinflamatorias, otros autores han encontrado que algunos derivados sintéticos de AU son ligandos de PPAR γ y es por esto que la actividad se observa en las últimas horas del experimento, debido a que su efecto es tardado ya que depende de la activación de moléculas río abajo en la cascada de señalización de la insulina.

Con este propósito, algunos autores han demostrado que otras especies de *Plantago*, como *P. lanceolata*, *P. maxima*, *P. major* y *P. psyllium*, disminuyeron significativamente el estado hiper glucémico, pero no reportaron ningún mecanismo de acción (**Goncalves y Romano, 2016; Rodríguez-Morán et al., 1998**).

Sin embargo, estos resultados sugieren que los compuestos responsables del efecto antihiper glucémico son polares, dada la naturaleza del extracto. Los compuestos reportados para *P. australis* son flavonoides, iridoides glicosilados, compuestos fenólicos y triterpénicos, entre otros (De Moura Sperotto, 2016), que podrían también ser responsables del efecto observado (Goncalves y Romano, 2016; Rodríguez-Morán et al., 1998).



Gráfica 1. Curva de Tolerancia a la Glucosa de EHAPa y EAcE (100 mg/kg) en ratas normoglucémicas. Los valores corresponden a la media \pm de EEM, analizados con la prueba de ANOVA de dos vías y ~~POS-HOC~~ *post-hoc* de Bonferroni (*p < 0.05)

Determinación de la actividad antidiabética aguda

Para determinar que *P. australis* posee propiedades antidiabéticas, se evaluó el EHAPa y el EAcE en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente, para observar si los extractos poseen esos efectos antidiabéticos agudos a 100 mg / kg.

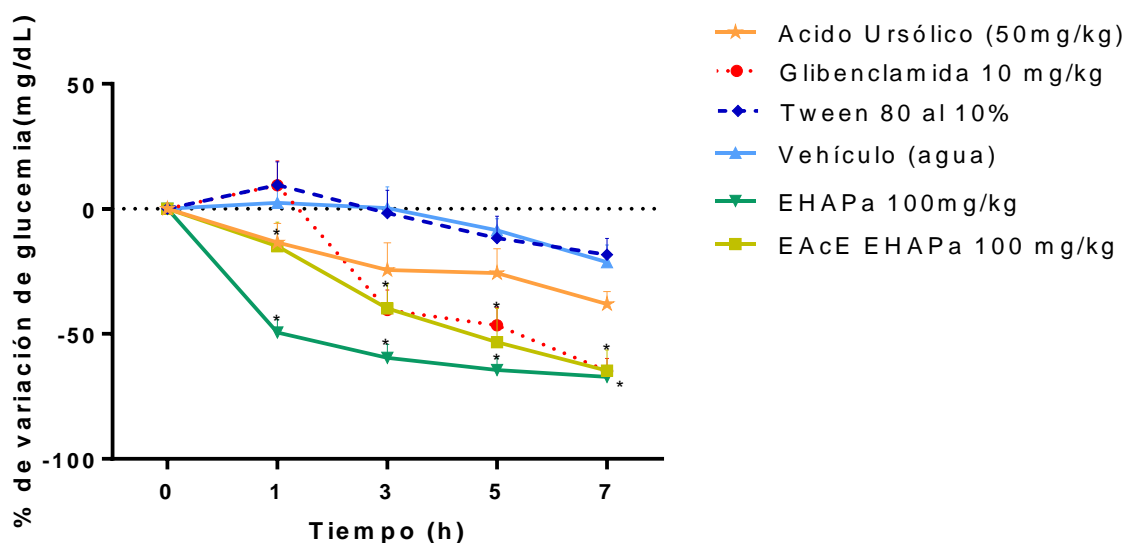
Así, el EHAPa presentó efecto antidiabético significativo desde la hora 1 y se mantuvo durante las 7 horas del experimento (Gráfica 2). Por otro lado, EAcE también disminuyó significativamente la glucemia a lo largo del experimento.

El EHAPa disminuyó más que EAcE, lo que puede deberse a que tiene mayor número de metabolitos, que podrían estar actuando de manera sinérgica y, por lo tanto, la disminución es mayor. Sin embargo, la EAcE también disminuyó de manera significativa



la glucemia durante todo el experimento. Cabe destacar que en la hora 7 el EHAPa empieza a mantener los niveles de glucosa, mientras que la EAcE sigue bajando los niveles, esto podría ser porque su efecto puede llegar a ser más tardado, ya que su mecanismo depende de la activación de receptores nucleares, lo cual sugiere la participación de mecanismos sensibilizadores a la insulina o alguna posible inhibición de PTP1-B debido a la presencia de AU en su composición (Ramírez et. al., 2011).

Hasta donde sabemos, este es el primer informe sobre el efecto antihiper glucémico y antidiabético de *Plantago australis*. Sin embargo, existen informes sobre las propiedades antiinflamatorias de varias especies de *Plantago*, como *P. lanceolata*, *P. major*, *P. erosa*, *P. altissima*, *P. reniformis* y *P. australis* (Goncalves y Romano, 2016; Palmeiro et al., 2002, De Moura, 2016), y la regulación de la respuesta inflamatoria puede estar involucrada en los mecanismos de sensibilización a la insulina, producidos por EHAPa. Además, Rodríguez-Moran et al. (1998) informaron que *P. psyllium* reduce la glucemia, los triglicéridos y el colesterol LDL en pacientes con DT2, asociado con mecanismos intestinales por el alto contenido de fibra de esta especie.



Gráfica 2. Determinación antidiabética aguda de EHAPa y EAcE (100 mg/kg) en ratas con un modelo DENID. Los valores corresponden a la media de EEM analizados con la prueba de ANOVA de dos vías y post-hoc de Bonferroni (*p < 0.05)



Estudio antidiabético subagudo

Variación de glucemia

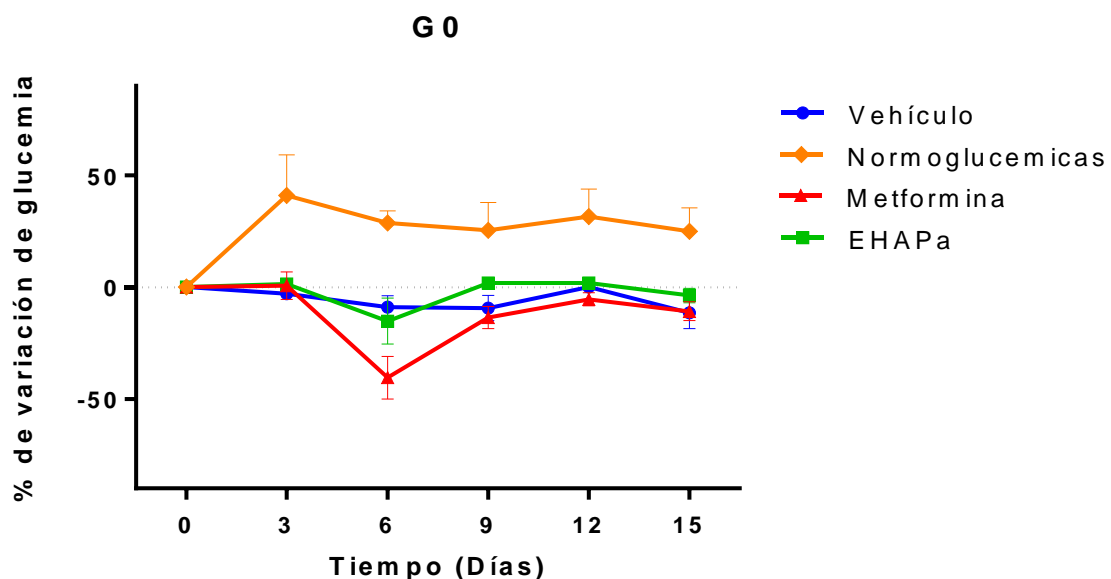
Para determinar los efectos a mediano plazo de la administración diaria del EHAPa, se hizo la administración subaguda durante un periodo de 15 días a los animales diabetizados con STZ y ND.

En la gráfica 3 (G0) se observa el porcentaje de variación de glucosa 24 horas después de la administración diaria del EAHPa (100 mg/kg). Como se desprende de la misma, el efecto mostrado por la muestra de prueba no presenta ninguna diferencia significativa con respecto al grupo control (vehículo) lo que sugiere que la actividad antidiabética, observada en el estudio agudo, no es lo suficientemente prolongada para observar efecto 24 horas después de la administración, esto debido a que las concentraciones de los metabolitos bioactivos disminuyan significativamente relacionado con su metabolismo y/o a una rápida eliminación de los mismos REFERENCIA. Por otro lado, en la gráfica 4 (G5) se presenta el porcentaje de variación de glucemia 5 horas después de la administración diaria del EHAPa, observándose una disminución significativa de los niveles de glucemia en los animales tratados con el EHAPa los días 6, 12 y 15, y un efecto antidiabético sostenido durante el periodo de experimentación. Este efecto fue similar al mostrado por el control positivo (metformina). Una vez que se terminó el tiempo de administración los animales fueron anestesiados, y a través de una punción cardiaca, se obtuvieron las muestras de sangre que fueron analizadas para determinar los perfiles lipídicos y glucosa. En las gráficas 6 podemos observar que el tratamiento a 15 días con el EHAPa induce una disminución significativa del colesterol total (grafica tal) y del LDL (inciso tal) sin observar cambios significativos en las concentraciones de HDL. Por otro lado, se observó una tendencia a disminuir los niveles plasmáticos de triglicéridos sin existir diferencias estadísticas significativas probablemente provocado por el error estándar grande en el grupo de los animales control. Finalmente, y como se esperaba, se determinó una diferencia significativa en los niveles plasmáticos de glucosa finales lo que sugiere una eficacia en el tratamiento con EHAPa para el control de las dislipidemias e hiperglicemias observadas en los modelos experimentales de diabetes tipo 2. Así podemos corroborar lo observado en estudios anteriores a nivel molecular que



establecen un aumento en la expresión génica de PPAR γ y Glut4 en células 3T3L-1 que sugieren un efecto insulinosensibilizador (tesis fabi).

En el desarrollo de fármacos antidiabéticos orales es necesario realizar la investigación de su eficacia en modelos murinos a mediano y largo plazo, debido a que son enfermedades crónicas y que necesitan un control adecuado de los parámetros bioquímicos relacionados. Esto permitirá en un futuro tener pacientes con una mejor calidad de vida y una disminución significativa de las complicaciones relacionadas con estas alteraciones metabólicas (referencia).



Gráfica 3. Estudio antidiabético subagudo del EHAP α (100 mg/kg) en ratas con un modelo DENID (glucosa al tiempo 0).

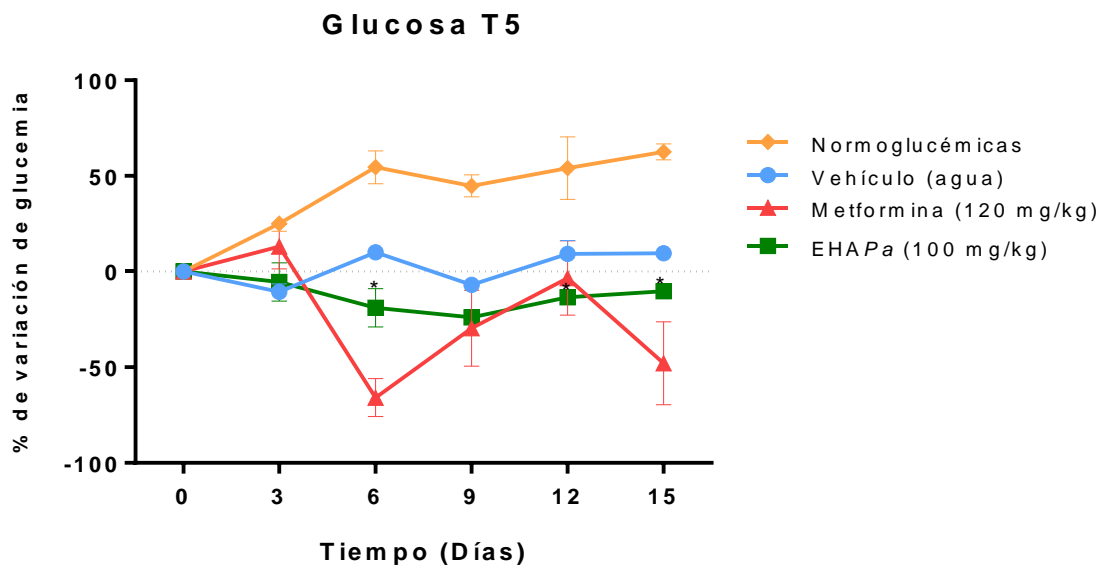
Los valores corresponden a la media de EEM analizados con la prueba de ANOVA de dos vías y ~~POS-HOC~~ *post-hoc* de Bonferroni (*p < 0.05)

En la gráfica 3 se observa la variación de glucemia donde no hubo disminución significativa en ningún día, en comparación con el vehículo (agua); sin embargo, hubo tendencia a bajar la glucemia conforme van pasando los días. Por lo que nos lleva a sugerir que serían necesarias más administraciones del EHAP α , ya que su efecto no se ve de manera acumulativa, además es de destacar que el tiempo del experimento fue



muy corto, probablemente se requeriría realizar el experimento por un tiempo más prolongado para observar mejores resultados.

En la gráfica 4, se muestran los resultados de la medición de glucemia 5 horas después de la administración del EHAPa, esto con la finalidad de dar tiempo que el metabolismo se lleve a cabo. La disminución de la glucemia comparada con el vehículo fue significativa los días 6, 12 y 15. Si bien su efecto no se ve tan marcado, si fue significativo. Dado que el mecanismo de acción que se le atribuye al EHAPa es insulinosensibilizador, se puede apreciar su efecto 5 horas después de su administración (Ramírez-Espinosa, et al 2014).

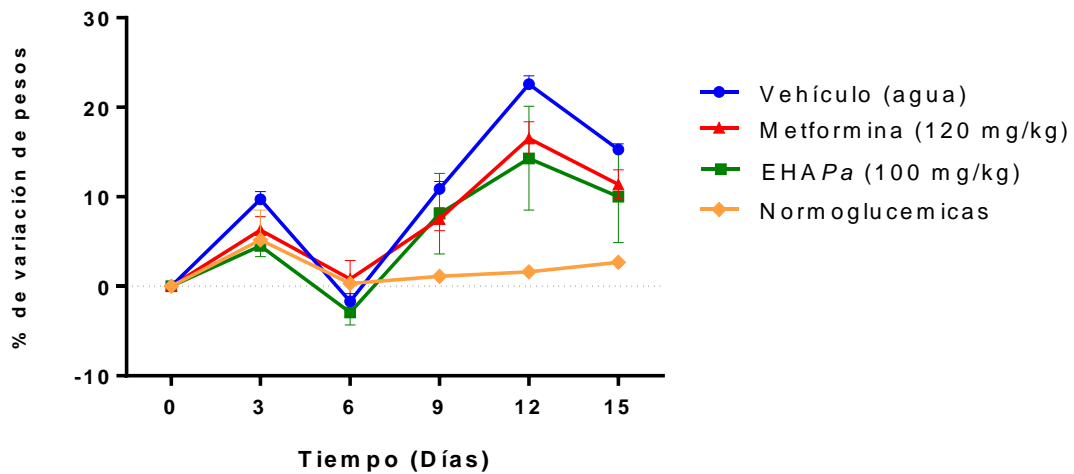


Gráfica 4. Estudio antidiabético subagudo del EHAPa (100 mg/kg) en ratas con un modelo DENID (glucosa al tiempo 5).

Los valores corresponden a la media de EEM analizados con la prueba de ANOVA de dos vías y POS-HOC de Bonferroni (*p <0.05)

Porcentaje de variación de pesos

En la gráfica 5 se presentan los resultados del monitoreo de pesos de los grupos empleados en este experimento. Se observa que no hubo cambios significativos en ninguno de los grupos, cabe señalar que el tiempo de tratamiento fue muy corto para obtener cambios significativos, como es el caso cuando metformina es el tratamiento para diabetes ya que se ha reportado disminución de peso en los pacientes que utilizan este fármaco; sin embargo, este efecto se observa a partir de la semana 5 (Turner, et al., 1999).



Gráfica 5. Porcentaje de variación de pesos.

Los valores corresponden a la media \pm EEM, analizados con la prueba de ANOVA de dos vías y *post-hoc* de Bonferroni (* $p < 0.05$)

CONCLUSIONES

El tratamiento con EHAPa en animales normogluicémicos (CTG) y diabetizados mostraron la eficacia antidiabética del extracto relacionadas con un efecto insulinosensibilizador.

Se estableció que uno de los componentes bioactivos responsables de la actividad antidiabética mostrada por el EHAPa es el ácido Ursólico, cuyos efectos antidiabéticos han sido descritos ampliamente en la literatura.



Referencias

- Vergara Martínez, Víctor , Samuel E. Estrada Soto, José de Jesús Arellano-García, Julio C. Rivera Leyva, Patricia Castillo España, y Irene Perea Arango. «Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Enhanced the Production of Ursolic and Oleanolic Acid in Callus Cultures of *Lepechinia C.*» *Pharmacognosy Magazine*, 2018.
- Barrera, F.C. Carramiñana. «Papel de los hipoglucemiantes Clásicos en el tratamiento actual.» *SEMERGEN*, 2014: 9-15.
- Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> (último acceso: Febrero de 2020).
- Cerón Romero, Litzia Christell. «Estudio del efecto antidiabético subagudo de un derivado semisintético del ácido morónico en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente y determinación de factores moleculares.» Tesis de maestría, Cuernavaca, Morelos, 2016.
- Cervantes, Rodolfo, y Presno Jose. «Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células B pancreáticas.» *Revista de endocrinología y nutrición*, 2013: 98-106.
- Chavéz Silva, Fabiola. «Estudio farmacológico, toxicológico y químico preliminar de *Achillea millefolium* y *Plantago australis* como potenciales agentes antidiabéticos.» Tesis, doctoral., Cuernavaca, Morelos, 2019.
- De Moura Sperotto, N.D., Steffens, L., Veríssimo, R.M., Henn, J.G., Péres, V.F., Vianna, P., Bogo Chies, J.A., Roehe, A., Saffi, J., Moura, D.J., 2018. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. *J. Ethnopharmacol.*, 225, 178-188.
- Federación Internacional de la Diabetes. «Atlas de la diabetes de la FID.» Atlas de la diabetes, 2019.
- Goncalves, S., Romano, A., 2016. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *Ind. Crops Prod.*, 83, 213-226
- Henn, J.G., Steffens, L., de Moura Sperotto, N.D., de Souza Ponce, B., Veríssimo, R.M., Boaretto, F., Hassemer, G., Péres, V.F., Schirmer, H., Picada, J.N., Saffi, J., Moura, D.J. 2019. Toxicological evaluation of a standardized hydroethanolic extract from leaves of *Plantago australis* and its major compound, verbascoside. *J. Ethnopharmacol.*, 229, 145-156



Instituto de botánica Darwinion. *Darwin.edu.* s.f.
<http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=australis&especie=australis&genero=Plantago&espcod=2914> (último acceso: Abril de 2020).

Olvera, Patricia, Guillermo Amador, y Luis Hernandez. «Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogenesis y especificación celular endocrina.» *Bio Med Hosp Infant*, 2008: 306-324.

Organización Mundial de la Salud. «Informe mundial sobre la diabetes.» Resumen de orientación, 2016.

Organización Panamericana de la Salud. «Buenas Prácticas de Farmacovigilancia para las Américas.» *Red PARF Documento Técnico No. 5*. Washington, DC, 2010. 13/94.

Ornelas Mendoza, Kathia Gisela. «Determinación del efecto antidiabético y estudio toxicológico del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis* en modelos in vivo.» Tesis de licenciatura, Cuernavaca, Morelos, 2018.

Ortiz, R., y otros. « Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycemic and NIDDM rat models and its implication on extrapancreatic glucose regulation.» *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2008: 1097-1104.

Palmeiro, Nayana, Cybele Esteves Almeida, Paulo Ghedini, Leticia Goulart, y Bernardo Baldisserotto. «Analgesic and anti-inflammatory properties of *Plantago australis* hydroalcoholic extract.» 2002: 89-92.

Palmiero, N. S., y otros. «Oral subchronic toxicity of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves.» *Journal of Ethnopharmacology*, 2003: 15-18.

Rodríguez-Morán, M., Guerrero-Romero, F., Lazcano-Burciaga G., 1998. Lipid- and glucose-lowering efficacy of *Plantago psyllium* in type II diabetes. *J. Diabetes Complications*, 12, 273-278

Ramirez-Espinosa JJ, Rios MY, Paoli P, Flores-Morales V, Camici G, de la Rosa-Lugo V, Hidalgo-Figueroa S, Navarrete-Vázquez G, Estrada-Soto S. 2014. Synthesis of oleanolic acid derivatives: In vitro, In silico studies for PTP-1B inhibition. *Eur J Med Chem*. 24. 316-2.

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Kathia Gisela Ornelas Mendoza

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico preliminar y determinación del efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis*”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2022-04-29 18:28:40 | Firmante

WKCravT6Gn9vI4clTFRuTYQXhuSHFtbaddHC7LJxBdtUEPQYNoWEov8hrfPp82XQh5IPvcM1nL7g4YWMLvBZSbj2uAshonr4XwCoD4GyJ6w30CqZXaJ/gung/NDGgOeDGHUqL6JB2jCOuW/u2glW2qWw1aaj+z9cu2FJWB2xC0aabHJH0XzxivaSnc3vrwiwPwMhLkOOe1pLX9MZu62Y5mMEhjWnHjqIV+1GgsZJfyMuPC/Tsmrc5jVeo+Sediw70KGdD59NDi5a7hdxsDzkyUs5itHDMWaOjw8kauaEUuzaFBolP2dGkPvdginqcA849eaEjSSUqzYjKyRCHZ2A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



8ykWXcgoV

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HQEh2CqLU9zcajc6O7JLOmxnLk6XJsm3>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Kathia Gisela Ornelas Mendoza

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico preliminar y determinación del efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis*”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2022-05-19 18:32:47 | Firmante

CY7MJ61QAMeCwExPeATMU3G0MInSHudgx/4TDrytQH88UgQirX9cPDCbDJGoQ7jnf4EGV4++Kh6x8iXdkbFwXzQExHJJKAd+FMRLRjMy0vZYDhxp+d4v5DjKoonUzCjGr2T9sujPgaP+D69bALMn64T5/ugiyzy/ebw0La3dSgrOQGOH6lc8dgTGFZ3xtcx1eqn40+oG5Cgz/R8oSF0XjNlc4wa1XpPjZw+sE8ih6cgSRN3PJgRBGhVR23PrQup82eBTuO/oMx/Xs0L4NRoU5KzH8tSBqo73apSGrfPGSSnGF0ay1wF4UgE6uQOijtw2rHyguho2166bGU6x2IXNzg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



U1Q5rtdkl

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/OBXVBDcSt4EhGzIueNVF1O4r0wkTdU3m>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Kathia Gisela Ornelas Mendoza

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico preliminar y determinación del efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis*”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2022-05-02 17:14:45 | Firmante

Fpy3OLnTVb3nchM1hegBIGKMvn3Yjffws.JvL8NQUOZ/pbFT4Lu6YnLz966h/O9O7hmo80FXQQ9CrHHYyQ2qGrtI9n9TsKmbEn0iBEFWG4fO+yOENB6b2wtWmCXrCNufXF9ypLR8A52e/s4SysysfSU8cAjfLZBtVVKenrTMAo5IZtjTn+sT0VgbZWKf4YO9Rb/VtZ1d5821+MRiZ4yJ9HpABAD/2Mqa3baSDk5jxKyH3SW8TQ/SijS43sK2UVPFR25YIRB BopasxPt7F/NzqYVBSEBCjBpMP8LBg0STry6dekQLZk6IL9nA4RxEx6MhZolu3FXP3SzGVRdJ0p2ZJA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



z8tBeFhwM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dPyhnl7B9p7JXLEO01Uhkqu2ScDIUV0t>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Kathia Gisela Ornelas Mendoza

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico preliminar y determinación del efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis*”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIO CESAR ALMANZA PEREZ | Fecha:2022-04-30 10:57:02 | Firmante

ew8fHGt3OaN+17J371K8WJM/rhwHWYJ5cCxcgvGV+X6aogLhbLxnDzYK4HDW5qTCrBToFSTg/ax2xYJ5vBGZG8pC9ysjA7WlITZgTiFenFS595KNieqtWg1kXP0MVA7pbZ/HXQEr7deFt33n01ofohAARz0u3pdUP4j8Mxd5qB1MH5+Y4F6sNeo33iElghK4vAKa/g+qfVvQ1fgBC/FI6soPXNCFrYDouvKol7Gb1YOI4pqxqW9WqbqRL1xmHte4RgiHI3+4VY2/1I2X9P7Rbb3hMj7XANKcRWdxivinFI170cmxTdJkkgAJ7qFoMKWtcC81qeF+kqWJBlmpuB3g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Fh51aDSHP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7b8XoCCsRRvWMoc6HaqV7Ds3USSoWCIC>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Kathia Gisela Ornelas Mendoza

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico preliminar y determinación del efecto antidiabético subagudo del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis*”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Firma del miembro del jurado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2022-04-29 21:31:58 | Firmante

G5nL2JqTrKHgAQ2CRbcTpjF6auo1hWJ1BYz3FkCsYtb7VUp6vP+WTSxHmBIKty6MaWXxYBM4yOf/Czq0meYmCp9IYdom3lnKj4eiEQkbBCs6EjHGDTEtgJkEG2Bxxu1I/kFUuJyfN/9xHdxQYUuENYEznbqro+JfF9kR7eCUAHOK96s4EejyAF5Y7NTWulUYT2o8/yWtO0wGfZSeaCilWjNX7ZxD1IYHAbKNo2aCXsraZAAapuqvtdA5/KBNcZytNbmTm b/uQLPDKfZ4ikm4xbXsHtZ8G3Qh2t0ElhVDJS/CoWHhwjVCElsw5iLsy7F6eAx41Pk23H74j1TYrL9Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



YEOQ1d3Tx

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/41tsGFZaEmERYOoL6xtmlZtKwyxP094>

