



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS**

Facultad de Farmacia

Determinación de los efectos
antidiabético,
antihipertensivo y toxicológico de
Eryngium heterophyllum

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN FARMACIA

P R E S E N T A

L.C. KENIA XITLALY SALAZAR LEZAMA

Director de tesis:

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto



AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por CONACYT a través del proyecto SEP-CONACyT Ciencia Básica (No. 167044)

A CONACyT por la beca de maestría otorgada número 717192.

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por proporcionarme las instalaciones y facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por la dirección de este proyecto, su apoyo, la confianza de integrarme a su grupo de trabajo y por compartir sus conocimientos.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, el Dr. Germán Bernal Fernández y el Dr. Julio Cesar Rivera Leyva, por la revisión, sugerencias y aportaciones realizadas durante el desarrollo de la investigación y elaboración de la tesis.

A mí jurado evaluador de tesis integrado por el Dr. Germán Bernal Fernández, el Dr. Cairo David Toledano Jaimes, el Dr. Antonio Monroy Noyola y al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, por los comentarios y aportaciones realizados al presente trabajo

Al Dr. Oscar Peralta Zaragoza del Instituto Nacional de Salud Pública por el apoyo y la confianza de permitirme trabajar en su laboratorio.

A la Bióloga Elideth del Centro Médico UAEM, por su apoyo en la realización de los perfiles bioquímicos.

A los animales de experimentación utilizados a lo largo de este proyecto, gracias por su vida a favor de la ciencia.



DEDICATORIAS

Este trabajo, así como todo lo realizado en el camino a su culminación, está dedicado a las personas que construyeron los cimientos que sostienen mi existir, mi familia, mis amigos, mis maestros, y al más especial de todos, a Dios.

La presentación de este trabajo de tesis no solamente materializa el término de una maestría, también representa el trabajo realizado a través de estos años, el cual no sería posible sin el apoyo de increíbles personas presentes a lo largo de este trayecto.

A mi madre; por la dedicación, cariño y el apoyo incondicional que siempre me has brindado, gracias por ser mi ejemplo y mi refugio a lo largo de mi vida. Siempre querré ser tan valiente como tú.

A mi hermano Adriel, te quiero mucho enano, gracias por estar siempre conmigo.

Al Dr. Samuel E. Soto, muchas gracias por haber compartido su experiencia y conocimientos a lo largo de estos años y por la oportunidad de ser parte del L10.

A mis asesores y amigos ganados en todo este proceso: M.C. Luis Roque, Dra. Gabriela Campos, L.F. Kathia Ornelas, M.F. Karla C. Torres, les agradezco todo el apoyo, la dedicación, el tiempo, los conocimientos compartidos y la confianza que me han brindado siempre. Sumado a todo eso, gracias por su incondicional amistad.

Kenny



INDICE

ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE GRÁFICAS.....	X
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	9
3. MARCO TEÓRICO.....	11
3.1 PLANTAS MEDICINALES.....	12
3.1.1 Farmacognosia.....	13
3.1.2 <i>Eryngium heterophyllum</i>	13
3.1.2.1 Descripción.....	14
3.1.2.2 Distribución en México.....	15
3.1.2.3 Antecedentes farmacológicos.....	16
3.1.3 Plantas medicinales y Diabetes.....	17
3.2 DIABETES.....	18
3.2.1 Clasificación de Diabetes.....	19
3.2.1.1 Diabetes tipo 1.....	20
3.2.1.2 Diabetes gestacional (DG).....	20
3.2.1.3 Diabetes tipo MODY.....	21
3.2.2 Diabetes tipo 2.....	22
3.2.2.1 Fisiopatología de DT2.....	23
3.2.2.2 Liberación, función y acción de la insulina.....	25
3.2.2.3 Resistencia a la insulina (RI).....	27
3.2.3 Criterios de diagnóstico de DT-2.....	29
3.2.4 Tratamiento de DT-2.....	30
3.2.4.1 Tratamiento farmacológico de DT-2.....	30
3.2.5 Diabetes e Hipertensión Arterial.....	35
3.3 HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	37
3.3.1 Definición de HTA y prevalencia.....	37
3.3.2 Clasificación de HTA.....	37
3.3.3 Criterios de diagnóstico para HTA.....	39
3.3.3.1 Presión sanguínea.....	39
3.3.3.2 Flujo y Resistencia Vascular.....	41
3.3.3.3 Fisiología de la presión.....	43
3.3.3.3.1 Músculo liso (ML).....	44
3.3.3.3.2 Musculatura vascular lisa (CMLV).....	45
3.3.3.4 Mecanismo general de contracción muscular.....	46



3.3.4	Tratamiento de HTA.....	47
4.	JUSTIFICACIÓN.....	49
5.	HIPOTESIS.....	51
6.	OBJETIVO GENERAL.....	53
7.	OBJETIVO ESPECIFICOS.....	55
8.	METODOLOGIA.....	57
8.1	Material vegetal y obtención de extractos orgánicos de <i>E. heterophyllum</i>	58
8.2	Evaluación farmacológica en modelo ex vivo.....	59
8.2.1	Determinación del mecanismo de acción del extracto más activo.....	60
8.2.1.1	Contracción inducida por KCL.....	60
8.2.1.2	Participación de los canales de Ca ²⁺	61
8.3	Modelo antihipertensivo agudo.....	62
8.4	Determinación del efecto antihiperglicémico y antidiabético.....	62
8.4.1	Curva de tolerancia a glucosa (CTG).....	62
8.4.2	Inducción al modelo experimental de diabetes no insulino- dependiente.....	63
8.4.2.1	Ensayo antidiabético agudo.....	63
8.4.2.2	Ensayo antidiabético sub-agudo.....	63
8.4.2.2.1	Determinación del perfil bioquímico.....	64
8.5	Estudios toxicológicos.....	64
8.5.1	Evaluación toxicológica aguda.....	65
8.5.2	Evaluación toxicológica subcrónica.....	65
8.6	Análisis estadístico.....	66
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
9.1	EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA EN MODELO EX VIVO.....	68
9.1.1	Evaluación del efecto de los extractos orgánicos de <i>Eryngium heterophyllum</i>	68
9.1.2	Determinación del efecto vasorrelajante del EHeEh.....	70
9.1.3	Determinación del mecanismo de acción.....	72
9.1.3.1	Participación de canales de Ca ²⁺ por KCl.....	72
9.1.3.2	Participación de los canales de Ca ²⁺ por CaCl ₂	73
9.2	Efecto del ensayo antihipertensivo agudo de EHeEh en ratas SHR.....	74
9.3	Efecto antihiperglicémico en ratas Wistar normoglucémicas.....	76
9.4	Efecto antidiabético agudo del EHeEh en un modelo de diabetes.....	80
9.5	Efecto antidiabético sub-agudo del EHeEh en un modelo de diabetes.....	81
9.5.1	Análisis de perfil de glucosa y lípidos.....	85
9.6	Evaluación toxicológica aguda.....	89
9.7	Evaluación toxicológica subcrónica.....	90
9.7.1	Porcentaje de variación de peso de órganos extraídos.....	92
9.7.2	Cuantificación de transaminasas.....	93
9.7.3	Análisis histopatológico de los órganos extraídos.....	95



9.9	Parte química.....	97
9.8	Cromatografía de los extractos orgánicos de <i>E. heterophyllum</i>	98
10.	CONCLUSIONES.....	99
11.	PERSPECTIVAS.....	101
12.	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	103



ABREVIATURAS

1.	DM	Diabetes mellitus	29.	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
2.	HTA	Hipertensión Arterial	30.	PDK1	Proteína 3-fosfoinositida dependiente de la proteína quinasa-1
3.	CE ₅₀	Concentración inhibitoria media	31.	AKt	Serine/threonine kinase 1
4.	E _{max}	Efecto relajante máximo	32.	NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las célula B activadas
5.	EHEE h	Extracto Hexánico de <i>Eryngium heterophyllum</i>	33.	JNK-AP1	Factor de transcripción de la proteína activadora 1
6.	NA	Noradrenalina	34.	KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
7.	PSIS	Presión Arterial Sistólica	35.	NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
8.	PDIA	Presión Arterial Diastólica	36.	PIP3	Vía de fosfatidinositol 3
9.	FC	Frecuencia cardiaca	37.	HbA1c	Hemoglobina glicada
10.	OMS	Organización mundial de la Salud	38.	ARN	Ácido ribonucleico
11.	Msn m	Metros sobre el nivel del mar	39.	GLUT 4	Proteína transportadora de glucosa
12.	ADA	American Diabetes Association	40.	ATP	Adenosin trifosfato
13.	IFD	Federación Internacional de la Diabetes	41.	PTB	
14.	RI	Resistencia a la insulina	42.	IRS	Sustrato proteico del receptor de insulina
15.	DT-1	Diabetes tipo 1	43.	PI-3K	fosfatidilinositol 3-cinasa
16.	DT-2	Diabetes tipo 2	44.	HDL	Colesterol de lipoproteínas de alta densidad
17.	DG	Diabetes Gestacional	45.	LDL	Colesterol de lipoproteínas de baja densidad
18.	MOD Y	Maturity-onset diabetes of the young	46.	VLDL	Colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad
19.	HLA	Antígeno leucocitario humano	47.	NaCl	Cloruro de Sodio
20.	CTc	Células citotóxicas	48.	KCl	Cloruro de potasio
21.	NK	Natural killer	49.	mM	Milimolar
22.	GAD65 y 67	Descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 67	50.	MgSO ₄	Sulfato de magnesio
23.	Hps-65	Proteína de choque térmico 65	51.	CaCl ₂	Cloruro de Calcio
24.	AGL	Ácidos grasos libres	52.	IP3	Trifosfato de inositol
25.	PTG O	Prueba de tolerancia a la glucosa oral	53.	MLCK	Cadena ligera de la miosina
26.	CML V	Células del musculo liso vascular	54.	DG	Diacilglicerol
27.	ML	Musculo liso	55.	ATPasa	Enzima Adenosintrifosfatasa
28.	SNA	Sistema nervioso autónomo	56.	IECA	Enzima convertidora de angiotensina



Determinación de los efectos antidiabético,
antihipertensivo y toxicológico de
Eryngium heterophyllum



57.	OCD E	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico	63.	AST	Enzima Aspartato Aminotransferasas
58.	STZ	Estreptozotocina	64.	SGA	Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos
59.	PKC	proteína kinasa C	65.	GP	Glucosa plasmática
60.	AIIIR A	Bloqueadores de los receptores de angiotensina II	66.	i.p	Administración intraperitoneal
61.	EOx	Estrés oxidativo	67.	i.g.	intra-gastrica
62.	GA	Glucemia en ayunas	68.	ALT	Alanino Aminotransferasas



LISTADO DE FIGURAS		Pag.
Figura 1	Fotografía de <i>Eryngium heterophyllum</i> , especie de planta medicinal perteneciente a la familia Apiaceae.	15
Figura 2	Prevalencia de diabetes a nivel mundial 2021.	19
Figura 3	Fisiopatología de Diabetes tipo 2.	24
Figura 4	Acción de la insulina de manera normal.	26
Figura 5	<i>Resistencia a la insulina</i> . Puntos de interferencia de las citocinas en la señalización de la insulina.	28
Figura 6	Principales venas y arterias del sistema circulatorio y su conformación.	42
Figura 7	Esquema general de la metodología.	58
Figura 8	Esquema de la evaluación del efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de <i>E.heterophyllum</i> .	60
Figura 9	Esquema de la evaluación del efecto vasorrelajante sobre la contracción inducida con KCl.	61
Figura 10	Esquema de la evaluación del efecto vasorrelajante sobre la contracción inducida con CaCl ₂ .	61
Figura 11	Histología del Hígado, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 40X y 20X.	95
Figura 12	Histología del Corazón, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 20X	96
Figura 13	Histología del Riñón, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 20X.	96
Figura 14	Histología del Pulmón, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 20X.	96
Figura 15	Placas cromatográficas de extractos orgánicos de <i>E. Heterophyllum</i> .	98
Figura 16	Placas cromatográficas del EHeEh de la Colecta 1 y Colecta 2.	98



LISTADO DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1	Clasificación de Diabetes Mellitus (ADA, et al., 2019).	19
Tabla 2	Criterios bioquímicos para el diagnóstico de diabetes tipo 2 (ADA, 2019).	29
Tabla 3	Clase de medicamentos utilizados para el tratamiento de diabetes tipo 2	31
Tabla 4	Clasificación de la HTA de acuerdo a la NOM.030-SSA2-2009	39
Tabla 5	Fármacos de primera elección para el tratamiento de la Hipertensión Arterial (Cruz T. et al., 2019)	48
Tabla 6	Porcentaje de relajación en aorta aislada de rata de la colecta 1.	70
Tabla 7	Porcentaje de relajación en aorta aislada de rata de la colecta 2.	70
Tabla 8	Porcentaje de relajación en aorta aislada de rata del EHeEh en presencia y ausencia de endotelio.	70
Tabla 9	Resultados de ensayo de toxicológico agudo en ratones de la cepa CD1.	90
Tabla 10	Asignación de los elementos de etiquetado de acuerdo a Sistema Mundialmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA).	90
Tabla 11	Rendimientos de los extractos obtenidos de <i>E. heterophyllum</i>	97



LISTADO DE GRÁFICAS

	Pag.
Gráfica 1. Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de <i>E. Heterophyllum</i> colecta 1	69
Gráfica 2. Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de <i>E. Heterophyllum</i> colecta2	69
Gráfica 3. Efecto vasorrelajante del EHeEh en presencia y en ausencia de endotelio.	71
Gráfica 4. Efecto del EHeEh en la contracción inducida por KCl .	72
Gráfica 5. Efecto de la CE_{50} del EHeEh en la contracción inducida por $CaCl_2$	74
Gráfica 6. Ensayo antihipertensivo agudo.	75
Gráfica 7. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar, colecta 1	78
Gráfica 8. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar, colecta 2	78
Gráfica 9. Curva de tolerancia a la glucosa. EHeEh1 vs EHeEh 2.	79
Gráfica 10. Ensayo del efecto antidiabético agudo del EHeEh.	80
Gráfica 11. Glucemia previa a administración (T0) oral subaguda del EHeEh	82
Gráfica 12. Glucemia post-administración (T5) oral subaguda del EHeEh	83
Gráfica 13. Porcentaje de variación de peso post administración oral subaguda de EHeEh	84
Gráfica 14. Perfil de Glucosa tras administración oral subaguda del EHeEh	85
Gráfica 15. Perfil de Colesterol total tras administración oral subaguda del EHeEh	86
Gráfica 16. HDL y LDL tras administración oral subaguda de EHeEh	88
Gráfica 17. Nivel basal de triglicéridos tras administración oral del EHeEh	88
Gráfica 18. Comparación de pesos del ensayo toxicológico subcrónico	91
Gráfica 19. Porcentaje de peso relativo de Hígado, Riñón, Corazón y Pulmón del ensayo toxicológico subcrónico.	92
Gráfica 20 Comparación de concentraciones de ALT y AST del ensayo toxicológico subcrónico	94



1. Resumen



Desde la antigüedad se ha mencionado el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de distintas enfermedades, es por ello que la obtención de metabolitos secundarios bioactivos a partir de extractos herbolarios ha dado paso al descubrimiento de novedosas entidades químicas con potencial uso en la terapéutica de diferentes enfermedades. En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo determinar el potencial efecto antidiabético y antihipertensivo, así como determinar la seguridad en su uso (toxicología) de los extractos orgánicos obtenidos de *Eryngium heterophyllum*, planta muy conocida empíricamente y usada en medicina tradicional debido a que se le atribuyen diversos usos, entre los que destacan, propiedades terapéuticas en el tratamiento de la diabetes, hipertensión arterial (HTA), artritis, disminución de colesterol y triglicéridos en sangre, venas y arterias, cálculos biliares y renales, la arterosclerosis y otras enfermedades crónico-degenerativas (Estrada., 2012).

Inicialmente se realizó la obtención de los extractos orgánicos (Hexánico, Diclorometánico y Metanólico) de *Eryngium heterophyllum* a partir de los cuales se realizaron todos los ensayos posteriores. Se evaluó *ex vivo* cada uno de los extractos, con el objetivo de determinar su efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata, resultando el extracto hexánico el más activo de los evaluados (~ 86.21 % de relajación, CE_{50} 337.05 ± 6.00 $\mu\text{g/mL}$). Debido a los resultados obtenidos del primer ensayo, se procedió a determinar el efecto vasorrelajante del extracto hexánico (EHeEh) en anillos de aorta aislada de rata en presencia (86.21 ± 6.68 % CE_{50} 337.05 ± 6.00 $\mu\text{g/mL}$) y ausencia de endotelio (69.78 ± 3.88 % CE_{50} 329.11 ± 2.35 $\mu\text{g/mL}$) pre-contraídos con noradrenalina (NA) [0.1 μM], en dicho ensayo pudimos determinar que el efecto del EHeEh es independiente de la presencia de endotelio.

Con base en los resultados obtenidos del extracto referido y para finalizar la parte *ex vivo*, se seleccionó el EHeEh para determinar su mecanismo de acción, los resultados obtenidos mostraron que el EHeEh induce una relajación en anillos de aorta aislada de rata a través de una posible vía de señalización independiente de



endotelio por medio del bloqueo de los canales de Ca^{2+} . Así mismo, se evaluó *in vivo* el extracto hexánico debido al efecto determinado previamente en los ensayos *in vitro*, por lo que se llevó a cabo un ensayo antihipertensivo agudo en ratas macho de la cepa SHR espontáneamente hipertensas, las cuales fueron administradas por vía intragástrica (i.g) y se monitorearon los registros de diferentes horas post-administración de la presión arterial sistólica (PSIS), diastólica (PDIA) y frecuencia cardíaca (FC), resultados que mostraron una disminución significativa ($p < 0.001$) de la PDIA obteniendo un efecto sostenido hasta la séptima hora.

Por otro lado, se determinó el potencial efecto antihiper glucémico de los extractos orgánicos de *Eryngium heterophyllum* mediante curvas de tolerancia a la glucosa (CTG) en ratas Wistar normoglucémicas a una dosis de 100 mg/kg con la finalidad de evaluar el comportamiento metabólico y la absorción de la glucosa. Los resultados obtenidos mostraron que los extractos orgánicos de *Eryngium heterophyllum* disminuían el pico hiper glucémico, siendo el EHeEh el extracto con un mayor efecto estadísticamente significativo respecto al control a los tiempos 0,5, 1 y 3 h. post administración vía oral. De esta manera se seleccionó al EHeEh para el ensayo antidiabético agudo y subagudo en un modelo DENID generado por la administración de Nicotidamda (ND) y estreptozotocina (STZ). Los resultados obtenidos el ensayo antidiabético agudo mostraron que el EHeEh fue capaz de mantener los niveles plasmáticos de glucosa a la baja comparados con el grupo control del vehículo (tween 80 al 10%) y el grupo control positivo administrado con glibenclamida (10 mg/kg). Dicho efecto se mantuvo así durante todo el estudio, mostrando una clara disminución respecto al tiempo de manera significativa.

Adicionalmente, en el ensayo de toxicidad aguda del EHeEh no hubo muertes registradas ni cambios conductuales aparentes en las concentraciones evaluadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg/) de acuerdo a lo establecido por la OCDE.

Finalmente, se evaluó la toxicidad a largo plazo mediante un ensayo subcrónico (28 días), el cual no mostró toxicidad aparente a una dosis de 100 mg/kg en



ratones de la cepa CD1. No se determinó diferencia significativa en la cuantificación de transaminasas evaluadas (Aspartato Amino Transferasa y Alanino Aminotransferasa), y de igual forma se comprobó la seguridad del extracto al evaluarlo histopatológicamente en diferentes tejidos involucrados en el metabolismo de las sustancias y que son vitales para el organismo (corazón, hígado, riñón y pulmón).

En conclusión, el extracto hexánico de *Eryngium heterophyllum* (EHeEh) fue el extracto más eficaz y potente al inducir una relajación significativa dependiente de la concentración e independiente de endotelio en los ensayos *ex vivo*, así como un posible mecanismo mediado por un bloqueo de canales de calcio, al cual se le atribuye el efecto en la disminución es la presión arterial diastólica del ensayo antihipertensivo agudo en ratas de la cepa SHR administradas a una sola dosis (312 mg/Kg) con el EHeEh.

Mientras que en la parte antidiabética, el EHeEh mostró efectos antihiperoglucémicos y antidiabéticos significativos en los modelos animales empleados, sugiriendo la participación de un posible mecanismo insulino-sensibilizador. Por otra parte, el EHeEh no mostró toxicidad aparente con base a los estudios toxicológicos realizados.



Abstract



Since ancient times, it was mentioned the use of medicinal plants for the treatment of different diseases, being one of most important source for the discovery of new bioactive secondary metabolites as novel chemical entities with potential uses in the treatment of different diseases. In this context, the objective of this study is to determine the antidiabetic and antihypertensive effects, as well as to determine the safety in its use (toxicology) of the organic extracts obtained from *Eryngium heterophyllum*, a plant well known used empirically in traditional medicine for the treatment of Diabetes, Arterial hypertension, arthritis, decreased cholesterol and triglycerides in blood, veins and arteries, gallstones and kidney stones, atherosclerosis and other chronic degenerative diseases (Estrada., 2012).

The organic extracts (Hexanic, Dichloromethanic and Metanolic) of *Eryngium heterophyllum* were obtained initially, from which all subsequent trials were carried out. Each of the extracts was evaluated *ex vivo*, with the aim of determining its vasorelaxant effect on rat aorta rings, being the hexanic extract the most active of those evaluated (E_{max} = 86.21 % relaxation, EC_{50} $337.05 \pm 6.00 \mu\text{g/mL}$). Due to the results obtained from the first study, the vasorelaxant effect of the hexanic extract (EHeEh) was determined on isolated aorta rat rings in the presence (E_{max} = 86.21 ± 6.68 % EC_{50} $337.05 \pm 6.00 \mu\text{g/mL}$) and absence of endothelium (E_{max} = 69.78 ± 3.88 % EC_{50} $329.11 \pm 2.35 \mu\text{g/mL}$) pre-contracted with noradrenaline (NA) [0.1 μM], in this experiment we determined that the effect of EHeEh was endothelium independent. Based on relaxant effect obtained from the extract assayed, the EHeEh was selected to determine its mechanism of action. Results indicate that EHeEh induces its relaxation through a possible signaling pathway independent of vascular endothelium by Ca^{2+} channels blockade. *In vivo* antihypertensive effect of the hexanic extract was determined due to the effect previously showed, and therefore an acute antihypertensive assay was performed in male SHR strain. These were administered intravagastic (i.g) and records of different post-administration hours of systolic (PSIS), diastolic (PDIA) and heart rate (HR) were monitored, showing a significant diastolic pressure decrease.



On the other hand, the potential antihyperglycemic effect of organic extracts of *Eryngium heterophyllum* was assayed by glucose tolerance curves (GTC) in normoglycemic Wistar rats at a dose of 100 mg/kg in order to evaluate the metabolic behavior and glucose absorption. Results showed that the organic extracts of *Eryngium heterophyllum* decreased the hyperglycemic peak, being EHeEh the extract with a greater statistical effect regarding control at time 0,5, 1 and 3 post-oral administration. Thus, EHeEh was selected for the acute and subacute antidiabetic studies in a non-insulin diabetic mice model (NIDMM) generated by the administration of Nicotinamide (ND) and streptozotocin (STZ). The acute antidiabetic trials showed that EHeEh was able to maintain plasma glucose levels down compared with the control (tween 80 at 10%) and positive control (glibenclamide, 10 mg/kg). The antidiabetic effect remains through the entire experiment.

In addition, there were no recorded deaths or apparent behavioral changes in the concentrations evaluated (5, 50, 300 and 2000 mg/kg/) as established by the OECD in the acute toxicity test for EHeEh.

Finally, long-term toxicity was evaluated by a subchronic assay (28 days), which showed no apparent toxicity at a dose of 100 mg/kg in mice of the CD1 strain. No significant difference was determined in the quantification of evaluated transaminases (aspartate amino transferase and alanine aminotrasnferase), and the safety of the extract was also verified by histopathologically evaluating different tissues involved in the metabolism of substances (heart, liver, kidney and lung).

In conclusion, the hexane extract of *Eryngium heterophyllum* (EHeEh) was the most effective and potent extract in inducing significant concentration-dependent and endothelium-independent relaxation in in vitro assays, as well as a possible mechanism mediated by a calcium channel block to which the effect on the decrease is attributed is the diastolic blood pressure of the acute antihypertensive trial in rats of the SHR strain administered at a single dose (312 mg/kg) with EHeEh.



Whereas in the antidiabetic part, EHeEh showed significant antihyperglycemic and antidiabetic effects in the animal models used, suggesting the participation of a possible insulin-sensitizing mechanism. Furthermore, EHeEh showed no apparent toxicity based on toxicological studies.



2. Introducción



Las enfermedades cardiovasculares se encuentran dentro de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y en México. Dentro de los factores de riesgo para sufrir estas patologías se encuentra la Diabetes y la Hipertensión arterial (HTA) que cada día se diagnostican con mayor frecuencia (Araya-Orozco., 2004).

Generalmente, la falla en lograr un control de HTA y Diabetes a menudo implica un problema de adherencia del paciente debido a que el tratamiento farmacológico incluye una politerapia que genera limitaciones de tipo socioeconómico y conductuales. Por tal motivo, se deben buscar agentes alternativos que presenten un efecto dual con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas para contribuir a reducir el costo económico y aumentar la adherencia al tratamiento (Esquivel., 2012). En este sentido, las plantas medicinales tienen reportadas diferentes actividades terapéuticas que debieran ser comprobadas mediante la investigación científica y poder ser utilizadas para coadyuvar en el tratamiento de dichas enfermedades.

En México las plantas medicinales han sido parte importante de la historia desde antes de la colonia, se han usado como medicina alternativa transmitiendo el conocimiento de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas (Carreón-Sánchez., 2013). Es por ello que el estudio de las plantas medicinales con potencial actividad terapéutica como lo es *Eryngium heterophyllum*, está plenamente justificada, ya que la misma es una planta muy conocida empíricamente, a la cual se le atribuye diversos usos, entre los que destacan, propiedades terapéuticas en el tratamiento de diabetes, hipertensión, artritis, disminución de colesterol y triglicéridos en sangre, venas y arterias, cálculos biliares y renales, la arterosclerosis y otras enfermedades crónico-degenerativas (Estrada., 2012).



3. Marco

teórico



3.1 PLANTAS MEDICINALES

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS., 2013) una planta medicinal es definida como cualquier especie que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la obtención y desarrollo de nuevos fármacos. Estas plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semi-sintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de fármacos sintéticos y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Roque., 2017).

En México las plantas medicinales han sido parte importante de la historia desde antes de la colonia, las plantas se han usado como medicina alternativa y este conocimiento se ha transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas (Carreón-Sánchez., 2013) En particular, México es un país de una gran riqueza biológica, ocupando el cuarto lugar entre los países considerados con mega diversidad biológica y posee cerca del 10% del total de las especies conocidas, y cuenta con una cantidad abundante de medicamentos herbolarios de los que no se tiene certeza de su especie, efectos secundarios, toxicidad, ni mucho menos de la acción terapéutica.

Se hace necesario resaltar que, a pesar de ser la medicina herbolaria una alternativa para la cura y tratamiento de diferentes padecimientos, aun no se cuenta con las suficientes bases científicas e investigación fitoquímica y farmacológica de las plantas tradicionalmente usadas, por esta razón es necesario que los consumidores dispongan de información que les permitan llevar tratamientos adecuados, seguros y eficaces. Al estudio de dichas plantas medicinales se le conoce con el nombre de farmacognosia.



3.1.1 Farmacognosia

El término "farmacognosia", como disciplina científica constituyente de la farmacia ha estado en uso durante casi 200 años, el cual proviene de las palabras griegas *pharmakon* (fármaco) y *gignosko* (adquisición de conocimientos) y fue utilizado por primera vez entre 1811 y 1815, y hacía referencia a la "rama de la farmacia que se encarga del estudio de plantas, animales o minerales, ya sean naturales en su estado original, original o preparado, o en forma de aceites esenciales, ceras, gomas y resinas" (Kingham., 2001). En la actualidad, la farmacognosia es la rama de la farmacología, definida como la ciencia molecular encargada de explorar la relación estructura-actividad de materias primas y las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal, sustancias tóxicas y otras sustancias con posibles usos como fármacos (Kuklinski., 2000).

3.1.2 *Eryngium heterophyllum*

El género *Eryngium* comprende más de 250 especies, algunas de las cuales se emplean como especias y plantas medicinales en diferentes partes del mundo (Seidemann., 2005). Es conocida en medicina tradicional y popularmente como "hierba del sapo" a esta se le atribuyen propiedades terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades o padecimientos como "mal de orín" y tos, colesterol, hipertensión, trombosis, embolias, infartos cerebrales, migrañas, varices, diabetes, triglicéridos, ácido úrico, cálculos biliares y renales, arteriosclerosis, impotencia, problemas de la próstata, angina de pecho, asma, cáncer, otras enfermedades crónicas degenerativas, cardiopatías, cólicos en la mujer, bronquitis, tos, diarrea, dolor de estómago, fiebres, padecimientos de vejiga, afecciones del hígado, padecimientos pulmonares, tos ferina, colelitiasis y bronconeumonía (Estrada., 2012). Posee propiedades hemolíticas (Arraiza., 2008)

La posología empírica recomendada es consumirla en su estado natural, la parte aérea de la planta se pulveriza y se hierve en agua, esta infusión se suministra de



acuerdo al padecimiento, esta última, reportada por estudios libres por parte del Dr. Erick Estrada en el programa Universitario de Plantas medicinales de la Universidad Autónoma de Chapingo (Estrada; 2012). Sin embargo, esta planta carece de estudios experimentales que validen sus atribuidas propiedades terapéuticas, y no está publicado ningún estudio sobre la actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria de la hierba del sapo ya que la planta se vende en México para tratar diabetes, hipertensión y artritis reumatoide (Mabberley; 2008, Estrada-Morales; 2002).

3.1.2.1 Descripción

Habitan principalmente en bosques de pino-encino en las partes altas del país; existen algunas especies que prosperan en lugares perturbados. Se encuentran frecuentemente en sitios abiertos de las orillas de las parcelas, en los alrededores de casas, en superficies degradadas y también en zonas de cultivo (Rzedowski., 2001, Sánchez., 2013). En México se distribuye principalmente en climas, secos, semisecos y templados, entre 1900 y 2750 msnm (metros sobre el nivel del mar). Crece en terrenos de cultivo abandonados o riego temporal. Son hierbas que alcanzan un tamaño de 40 cm a 1 m de altura. Las hojas son ásperas, rígidas, espinosas y con los bordes y nervios de color blanco. Las flores son unas esterillas verdes (*Figura 1*).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Orden: Apiales

Subreino: Traqueobionta

Subclase: Rosidae

Superdivisión: Spermatophyta

Clase: Magnoliopsida

División: Magnoliophyta

Género: *Eryngium*

Familia: Apiaceae

Especie: *heterophyllum*



Figura 1. Fotografía de *Eryngium heterophyllum*, especie de planta medicinal perteneciente a la familia *Apiaceae*.
Originaria de México NPIN (2013) Imagen tomada internet <http://www.wildflower.org/plants/>

3.1.2.2 Distribución en México

El género *Eryngium* incluye aproximadamente 250 especies distribuidas en las regiones templadas y tropicales del planeta (García-Ruiz., 2013), en el continente Americano se ha reportado su presencia del sur de Estados Unidos a Centroamérica, mientras que en México se distribuye altitudinalmente hasta los 3950 msnm y se han registrado 60 especies, colectándose en diversos estados de la república: Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor-Espinoza., 1998), (CONABIO., 2009).



3.1.2.3 Antecedentes farmacológicos

Investigadores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, y de la Universidad Nacional Autónoma de México realizaron pruebas con extractos etanólicos de *E. heterophyllum* en ratones para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria, sin embargo, la hierba no mostró efectos antiinflamatorios ni hipoglucemiantes (Carreón-Sánchez., 2013).

En otra línea de investigación, se realizaron estudios sobre la química de *E. heterophyllum*, en los cuales aislaron compuestos de la planta (manitol, glucosa y β -sitosterol). También llevaron a cabo ensayos con ratas tratadas con extractos acuosos o metanólicos de *E. heterophyllum*, obteniendo como resultado efectos hipo-colesterolémicos significativos, con una disminución entre un 20-27 % del nivel de colesterol total. Adicionalmente, se realizó un estudio con pacientes voluntarios, en donde no obtuvieron cambios estadísticamente significativos en los niveles de colesterol en sangre, sin embargo, la ineficacia del tratamiento para el colesterol pudo deberse a no haber controlado la dieta de los pacientes durante el estudio (Navarrete., 1990) (Palá., 2002), (Montes., 2017).

Otro ensayo realizado por investigadores de la Universidad Autónoma del Estado de México evaluaron el efecto del té PC-300 (*Eryngium heterophyllum* egelm + *Amphipterygium adstringens*) contra la hipertrigliceridemia. En el cual llevaron a cabo un estudio clínico no aleatorizado, descriptivo, prospectivo, longitudinal y comparativo de pacientes voluntarios tratados con el té, y un segundo grupo tratados con bezafibrato. En el primer grupo, el porcentaje de reducción de triglicéridos fue del 19,7% ($p \leq 0,05$), mientras que en el segundo grupo fue del 44,8% ($p \leq 0,001$). Concluyendo que el consumo de PC-300 (*Eryngium heterophyllum* egelm + *Amphipterygium adstringens*) reduce los niveles de triglicéridos en un promedio del 20% después de 1 mes (Gómez-Zerón., 2019).

3.1.3 Plantas Medicinales y Diabetes



Debido al creciente interés hacia las plantas medicinales usadas comúnmente por la población Mexicana desde hace ya muchos años atrás, la investigación en farmacognosia, ha demostrado con evidencias científicas que las plantas medicinales contienen principios activos capaces de ser identificados y aislados, así como también evaluar su efectividad y seguridad terapéutica, como lo es el caso de la Metformina (una biguanida), que es el fármaco utilizado en la terapia de primera línea actual para el tratamiento de la Diabetes tipo 2, y que es un derivado de un producto natural activo, la galegina, una guanidina aislada de la planta *Galega officinalis L* que fue usada desde el medioevo por personas diabéticas con una producción excesiva de orina (Andrade-Heinrich., 2005).

Si bien es difícil encontrar entre las plantas algún principio bioactivo capaz de imitar o sustituir a la insulina, si es posible encontrar moléculas capaces de estimular la biosíntesis y secreción de insulina por medio de diversos mecanismos de acción. Existe una amplia investigación sobre plantas clasificadas como hipoglucemiantes en donde se han encontrado una gran variedad de componentes tales como alcaloides, glucósidos, terpenos, flavonoides que entre otros han sido aislados para evaluar esta actividad.

Sin embargo, aún queda mucho por avanzar en la investigación de las plantas medicinales dado que la mayor parte de la población opta por utilizar concomitantemente, y en algunos casos únicamente, la fitoterapia como tratamiento para la Diabetes, como lo es el caso de *Eryngium heterophyllum*, que con base a la experiencia de pacientes diabéticos indican que recurren a vendedores de hierbas locales con el propósito de alcanzar la meta en el control de la glucemia. La cual a pesar de ser una planta muy conocida empíricamente existen datos y estudios farmacológicos limitados descritos para la planta.

3.2 DIABETES



La Diabetes, es una enfermedad crónica heterogénea, definida por la American Diabetes Association (ADA) como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico, la cual aparece con la destrucción de las células beta pancreáticas, provocando una deficiencia parcial o absoluta de insulina que produce, o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina presente (Schmidt., 2018). La característica definitoria de la diabetes es la presencia de hiperglucemia (aumento de glucosa en la sangre), lo cual conlleva al desarrollo tardío de complicaciones vasculares y neuropáticas que afectan casi todos los tejidos del cuerpo debido a que este padecimiento se asocia con daño a largo plazo, disfunción y fallo en diferentes órganos especialmente ojos, hígado, riñón, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Un conjunto de diversos procesos se encuentran estrechamente relacionados en el desarrollo de esta patología, como la participación directa del sistema inmunológico sobre las células β -pancreáticas, la resistencia a la insulina (RI) y el desorden del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Moso., 2015).

La carga de las complicaciones asociadas a la diabetes en todo el mundo es un importante problema sanitario (*Figura 2*). La prevalencia de la diabetes en el año 2021 fue la causa directa de 6,7 millones de muertes, y de acuerdo a la estadística de la Federación Internacional de la Diabetes (FID), se estima que para el año 2030 habrá 643 millones de adultos con diabetes y 784 millones para el año 2045. Tan solo hoy en día se calcula que 1 de cada 10 de los adultos de 20 a 79 años viven con diabetes, aproximadamente 537 millones de personas (FID., 2021).

En conjunto, estas estadísticas aleccionadoras de la diabetes y sus complicaciones subrayan la importancia vital de diseñar las mejores estrategias para la intervención terapéutica en este trastorno.



Figura 2. Prevalencia de diabetes a nivel mundial 2021. Datos de la décima edición del Atlas de la Diabetes de la FDI informan un aumento global continuo en la prevalencia de diabetes ("IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition," 2021)

3.2.1 Clasificación de la Diabetes

Tabla 1. Clasificación de Diabetes (ADA; 2019)

Diabetes tipo 1 (DT-1)	Causada por la destrucción autoinmune de las células β , que suelen provocar una deficiencia absoluta de insulina.
Diabetes tipo 2 (DT -2)	Causada por una pérdida progresiva de la secreción de insulina por las células β , con frecuencia superpuesta a una resistencia basal a la insulina.
Diabetes Gestacional (DG)	Diagnosticada durante el segundo o tercer trimestre del embarazo que no fue diabetes claramente manifestada antes de la gestación.
Otros tipos de diabetes:	p. ej., síndromes de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y diabetes juvenil de inicio en la madurez [maturity-onset diabetes of the young, MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por fármacos o productos químicos (como con el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH/sida o después de un trasplante de órganos).

Actualmente, la clasificación de la diabetes se basa en criterios etiológicos, los cuales se centran en el reconocimiento de la alteración de la célula beta pancreática como el defecto primario de la diabetes y se reconoce la interacción de la genética, resistencia a la insulina, factores ambientales, inflamación/sistema inmunológico sobre la función de las células β pancreáticas (Molina-Rodríguez., 2012). La diabetes se puede clasificar en las siguientes categorías generales:



3.2.1.1 Diabetes tipo 1:

También llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia, se caracteriza por una producción muy poca o nula de insulina en el páncreas y requiere la administración diaria de la hormona. Lo que ocurre básicamente en este tipo de diabetes es que la glucosa presente no puede ser internalizada a las células por la ausencia de insulina, provocando que esta se acumule en el torrente sanguíneo en lugar de entrar a las células, y como consecuencia la incapacidad del organismo para obtener energía. La causa exacta de diabetes tipo 1 se desconoce, pero se sabe que es una condición que ocurre cuando el sistema inmunitario ataca por error y destruye las células β en los islotes de Langerhans del páncreas. Sin embargo, durante la etapa previa al inicio de la diabetes tipo 1, en el 80 % de los individuos se detectan anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos o membranales de células β pancreáticas como la descarboxilasa del ácido glutámico 65 y 67 (GAD65 y 67), la proteína de choque térmico 65 (Hps-65), y contra insulina. Por lo que a pesar de que los mecanismo de destrucción o muerte de las células β - pancreáticas son diversos, involucran una respuesta autoinmune mediada por anticuerpos específicos contra proteínas de las células β , así como la actividad directa de las células inmunes como células T citotóxicas (CTc) y *natural killer* (NK). La tendencia de desarrollar enfermedades autoinmunes, incluyendo diabetes tipo 1, puede ser heredada a través de los padres, eso debido a algunos polimorfismos genéticos en los sitios de unión asociados al antígeno leucocitario humano (HLA clase II) del cromosoma 6 (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal., 2013).

3.2.1.2 Diabetes gestacional (DG):

Este tipo de diabetes afecta a mujeres embarazadas, con una incidencia de 3-10% por año. Puede ocurrir en cualquier momento durante el embarazo (aunque probablemente después de la semana 24) y generalmente desaparece después del embarazo. No se sabe con exactitud la causa de la diabetes gestacional, sin embargo, es caracterizada por hiperglucemia como consecuencia de hormonas producidas en la placenta, el aumento de estrógenos y progesterona produce



hiperplasia de las células β del páncreas y, por consiguiente afectan el metabolismo de los carbohidratos, aumentando la secreción de insulina. Los factores que contribuyen al aumento de la resistencia insulínica son la elevación de los ácidos grasos provenientes de la lipólisis y un ineficiente acoplamiento entre la activación del receptor de insulina y la translocación de los GLUT-4 a la superficie celular. Estos cambios son los responsables de la tendencia a la hiperglucemia, lipólisis e hipercetonemia existente en este período (Almirón-González, n.d.).

Durante la segunda mitad del embarazo, el metabolismo de los carbohidratos se afecta al aumentar la producción de somatostatina coriónica humana placentaria, prolactina, cortisol y glucagón, lo que contribuye a una disminución de la tolerancia a la glucosa y a mayor resistencia a la insulina (Cervantes-Villagrana & Presno-Bernal., 2013). Las mujeres con diabetes gestacional corren mayor riesgo de sufrir complicaciones durante el embarazo y el parto. Además, tanto ellas como sus hijos corren mayor riesgo de padecer diabetes de tipo 2 en el futuro.

3.2.1.3 Diabetes tipo MODY:

Diabetes del adulto de inicio juvenil (*maturity-onset diabetes of the young, MODY*) es responsable tan solo del 2-5% de todos los casos de diabetes y se caracteriza por una alteración heterogénea, cuyo inicio típico es la madurez, pero con una edad precoz de presentación por debajo de los 25 años.

Este tipo de diabetes es causado por una mutación en el gen de la enzima glucocinasa (hexocinasa), la cual se expresa en tejidos que regulan el metabolismo de la glucosa como el hígado y páncreas, y cuya función es actuar como “sensor” de la glucosa y así catalizar su fosforilación. Sin embargo, cuando las células β se someten a dosis altas de glucosa de manera crónica, se presentan dichas mutaciones que van a conllevar a una disminución de la cantidad y la actividad de la glucocinasa; además, la glicación de factores de transcripción del gen de glucocinasa, reduce el ARNm y se revierte con aminoguanidina (Tapia-Pérez., 2008).



3.2.2 DIABETES TIPO 2 (DT-2)

La DT-2 se define como un conjunto de enfermedades metabólicas de origen multifactorial, el cual se caracteriza por la presencia de hiperglucemia crónica, la cual es causada por defectos en la secreción o acción de la insulina.

La diabetes tipo 2 se define como un trastorno metabólico heterogéneo caracterizado por hiperglucemia crónica como consecuencia de una deficiencia en la secreción o acción de la insulina, es decir que, los adipocitos, hepatocitos y las células musculares no responden de manera correcta a la insulina producida, y esto se denomina 'resistencia a la insulina, dando como consecuencia que la glucosa presente en la sangre no pueda ingresar en las células.

También llamada diabetes no insulino dependiente, es el tipo más común de diabetes y representa más del 90% de todos los casos, con un porcentaje más elevado en regiones menos desarrolladas. Actualmente, es considerada como una pandemia debido al impacto generado por el incremento de la morbilidad y mortalidad a nivel mundial en los últimos años, convirtiéndola en un verdadero problema de salud mundial (Olga-Pereira., 2012). .

Actualmente en México, la DT-2 es uno de los principales problemas epidemiológicos y emergentes en nuestro país, y se ha observado un aumento continuo del padecimiento desde hace ya varias décadas y se espera que el número de pacientes con esta patología siga aumentando de manera exponencial. De acuerdo a la FDI, se estima que en el año 2019 cerca de 12.805,2 personas (20-79 años) presentaron diabetes y 89.011,7 muertes en ese mismo año están relacionadas directamente con esta afección (lo que equivale aproximadamente a una de cada 20 muertes, 8 700 muertes cada día y 6 cada minuto) consecuente a los cambios en el estilos de vida de la población, asociados al sedentarismo, la obesidad, la hipertensión arterial y otros factores de riesgo cardiovasculares. Por esas razones, ocupa la cuarta causa de muerte a nivel mundial' (Sanamé-Mirtha, & Jiménez Rizo., 2016).



Con base en lo anterior, se deben tomar en cuenta diversos factores de riesgo, ya que este padecimiento presenta una evolución silenciosa, progresiva e irreversible. Los factores ambientales (por ejemplo, la obesidad, una dieta poco saludable, la inactividad física, mala alimentación, participa en desarrollar hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, entre otras) y los factores genéticos contribuyen a las múltiples alteraciones fisiopatológicas que son responsables del deterioro de la homeostasis de la glucosa en la DT-2 (DeFrozo., 2015). Lo que también pudiera, en determinado momento, desencadenar complicaciones agudas (cetoacidosis y coma hiperosmolar), crónicas microvasculares (retinopatías y neuropatías) y macrovasculares (cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares y vasculares periféricas) (Sanamé-Mirtha, & Jiménez Rizo., 2016).

3.2.2.1 Fisiopatología de Diabetes tipo 2

En términos básicos, la fisiopatología de la DT2 se caracteriza por tres alteraciones fisiológicas: La primera es el trastorno de la secreción de la insulina que involucra principalmente un deterioro progresivo de la integridad de las células β pancreáticas, las cuales son encargadas de la secreción de la insulina en respuesta al incremento de la glucemia, pero hasta que la masa de células beta no disminuya por debajo del 50%, no se altera la glucemia basal. Las causas de la reducción de la masa de células beta no son bien conocidas. Se ha señalado la presencia de un estado de apoptosis acelerada que podría, al menos de forma parcial, estar determinada genéticamente o por factores ambientales como depósitos de amiloide pancreáticos que parecen potenciar la destrucción de las células beta, hiperglicemia y lipotoxicidad ya que la acumulación de ácidos grasos libres (AGL) ha demostrado tener un efecto deletéreo sobre la funcionalidad de la célula beta pancreática (Montero., 2007). La segunda es la resistencia periférica en donde el organismo no responde a la insulina que produce, por lo tanto la glucosa no puede ser internalizada a las células y esta permanece en la sangre, en donde los niveles de receptor de insulina y la actividad de tirosin-quinasa del receptor están disminuidos y son causadas generalmente por distintas



alteraciones, entre las que se incluyen mutaciones y/o modificaciones pos-traduccionales del receptor de insulina, del IRS o de moléculas efectoras localizadas río abajo del mismo. Sin embargo, a medida que aumenta la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensadora, se genera un estado crítico por parte de los islotes pancreáticos que se tornan incapaces de mantener un estado de hiperinsulinismo, provocando un gran aumento de glucemia posprandial. De este modo, cuando disminuyen aún más los niveles de secreción de insulina y aumenta la producción hepática de glucosa, aparece la diabetes manifiesta con hiperglucemia en ayuno, es en este punto crucial en donde finalmente ocurrirá el fallo en las células beta (Fauci., 2009).

Así mismo, la resistencia a la acción de la insulina altera la utilización de glucosa por los tejidos sensibles a la insulina y aumenta la producción hepática de glucosa, los que provocara la tercera alteración en la fisiopatología de la DT2, que es la producción excesiva de glucosa por parte del hígado, provocando hiperglucemia, (Figura 3).

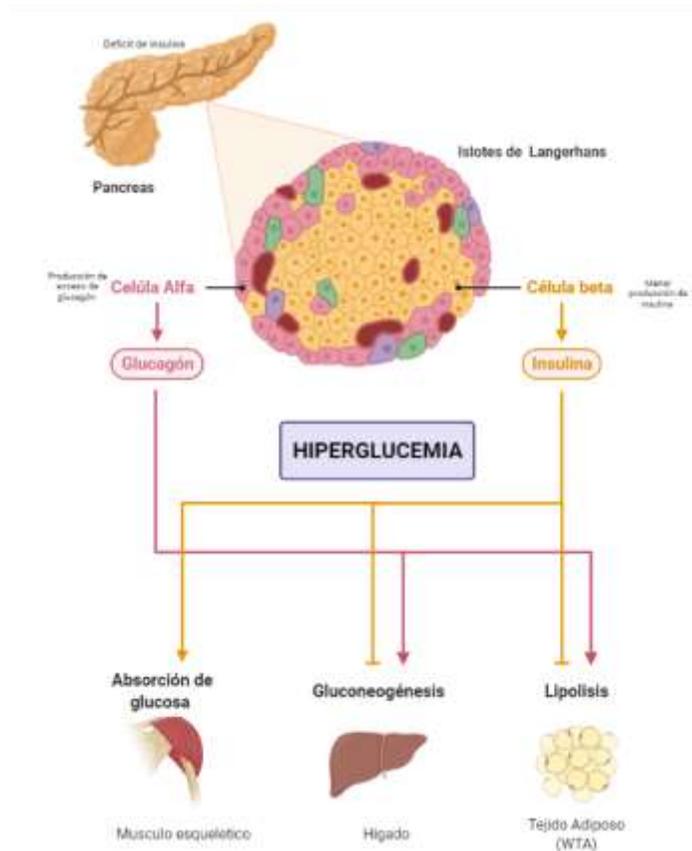


Figura 3. Fisiopatología de Diabetes tipo 2.



3.2.2.2 Liberación, función y acción de la insulina

La insulina es una proteína de 51 aminoácidos, formada por dos cadenas peptídicas A y B de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidos mediante enlaces covalentes por dos puentes di-sulfuro y un puente intracatenario, y es segregada por las células β del islote pancreático. La acción fundamental de la insulina es la homeostasis de la glucosa, para lo cual sus acciones metabólicas se desarrollan fundamentalmente en el tejido hepático, muscular y adiposo, puesto que estos tejidos son los responsables del metabolismo y almacenamiento de energía en el organismo, y desempeñan funciones importantes en el desarrollo de resistencia a la insulina, obesidad y DT-2, por lo que a pesar de que su función principal es regular el metabolismo de los carbohidratos, también cuenta con una importante participación en el metabolismo de lípidos y proteínas.

Sus acciones biológicas se inician cuando se une a su receptor, una proteína de membrana heterotetramérica unida por puentes disulfuros, que consta de 4 subunidades, 2α y 2β , ambos tipos de subunidades son glicoproteínas. La unión de la insulina a las subunidades α del receptor provoca un cambio conformacional de la subunidades β que se insertan a través de la membrana, lo que induce a la autofosforilación mediante la activación de la tirosina cinasa intrínseca del receptor y la fosforilación de otros sustratos subyacentes celulares (en los residuos de Tir), también llamados proteínas señales, incluyendo los sustratos proteicos del receptor de insulina (ISR). En el estado inactivo, el sitio catalítico de la cinasa Tir permanece bloqueado por un "circuito de activación" que previene el acceso de ATP y varios sustratos. Sin embargo, cuando la insulina circulante llega a los tejidos blanco en donde se une a su receptor correspondiente y se genera la atofosforilación de residuos de Tir en el "circuito de activación" ocasiona un cambio conformacional que permite al ATP y a los sustratos alcanzar el sitio catalítico, por lo que una vez activada la cinasa del receptor de insulina fosforila proteínas sustrato en los residuos Tir, y estos residuos Tir fosforilados sirven como sitios de acoplamiento para los efectores del receptor, que posteriormente transmitirán la señalización molecular intra-citosólica hacia el núcleo celular.



Las proteínas del receptor de insulina denominadas IRS contienen un dominio conservado PH y otro de unión fosfato-Tir denominado PTB con una porción terminal proteica COOH- cercana al dominio PH. El dominio PTB, comparte una secuencia de casi el 75% idéntica a las proteínas del receptor de insulina IRS-1 y IRS-2, y funciona como un elemento de acoplamiento para promover la interacción entre el receptor de insulina y la proteína como sitios de acoplamiento, entre ellos la subunidad reguladora p85 α de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI-3K).

La respuesta metabólica a la insulina es mediada primariamente por la vía de la PI-3K en donde la activación de la misma está dada por la asociación del complejo de proteínas p85/p110 de la PI-3K con las proteínas del IRS, lo cual estimula la producción de una enzima denominada PIP3, activando a su vez PDK1. Cabe resaltar la importancia de esta unión debido a la activación de la proteína AKt mediante una fosforilación que dará lugar al transporte de glucosa al interior de la célula, facilitado por la insulina, esto dado a que Akt es un “segundo mensajero” que interviene en la regulación de la translocación de GLUT4, el cual es el transportador de glucosa más importante sensible a la insulina expresado en músculo y tejido adiposo. Sin embargo, existen otras proteínas o segundos mensajeros que también son capaces de intervenir en la regulación de la translocación de GLUT4, estas son las isoformas de la protein-cinasa C (PKC) δ y γ , que son también activadas por PI-3K y PDK1.

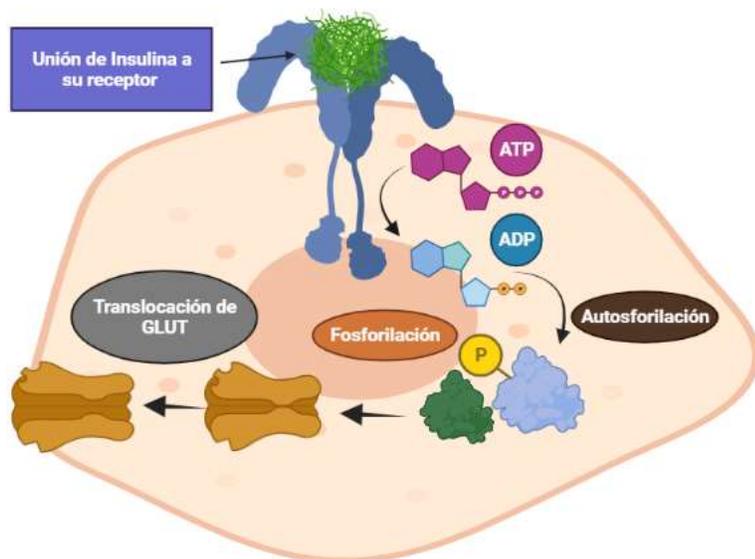


Figura 4. Acción de la insulina. De manera normal, al unirse la insulina a la subunidad alfa extracelular de su receptor, provoca un cambio conformacional que permite la unión de ATP a la subunidad β intracelular del receptor; esto promueve su autofosforilación y le confiere la actividad de tirosin-cinasa, por lo que se inicia la fosforilación en tirosina de las proteínas intracelulares llamadas sustrato receptor de insulina (IRS), las cuales poseen una región conservada que, una vez activadas, les permite interactuar con otras proteínas intracelulares, como la PI-3K, y Akt, que a su vez, entre otras acciones, promueve la translocación del transportador de glucosa (GLUT) a la membrana celular, con la posterior entrada de glucosa.



3.2.2.3 Resistencia a la insulina (RI)

La RI es un fenómeno fisiopatológico en el cual, para una concentración dada de insulina, no se logra una reducción adecuada de los niveles de glucemia, esta es una condición prevalente y generalmente asociada a distintas alteraciones, entre las que se incluyen mutaciones y/o modificaciones pos-traduccionales del receptor de insulina, del IRS o de moléculas efectoras de la vía de señalización localizadas río abajo del mismo.

Por lo que se sabe que es una condición que se desarrolla a partir de múltiples factores genéticos y ambientales como el sedentarismo y la obesidad. La RI está implicada no solo en el papel principal en el desarrollo de DT-2, sino además está relacionada con otros padecimientos como la hipertensión arterial, enfermedades de tipo cardiovascular, dislipidemias, a nivel de tejido adiposo, hígado y músculo esquelético (Mosso., 2018). Esto dado a que está presente en diferentes vías metabólicas, por lo que aumenta el riesgo de desarrollar diversas patologías de diferentes órganos y sistemas (Pollak., 2016).

Entre las alteraciones más comunes de la resistencia a la insulina se encuentran la disminución en el número de receptores de insulina y de su actividad catalítica, el aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr del receptor de insulina y del IRS, el aumento en la actividad de fosfatasas de residuos de Tyr, principalmente PTP1B, que participan en la desfosforilación del receptor y del IRS, la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del GLUT-4. Estas alteraciones reducen la incorporación de glucosa en el tejido muscular y adiposo y promueven alteraciones a nivel metabólico (Carrasco., 2013).

Por otra parte, el proceso de desarrollo de DT2 a partir de RI está dado y mediado por un proceso inflamatorio crónico, en el que básicamente el organismo genera una respuesta fisiológica de protección, generada para controlar agresiones químicas o biológicas, propias o externas al organismo. Este proceso se va a



caracterizar por presentar un elevado número de leucocitos y/o un incremento en los niveles de citocinas pro-inflamatorias en la circulación o en tejidos.

Adicional a esto, existe evidencia científica que demuestra que un incremento en la acumulación de lípidos, particularmente en el tejido adiposo, presente en un estado de obesidad, provoca un aumento en el tamaño de células lo que se conoce como hiperplasia. Este proceso, a su vez, provoca presión en los capilares encargados de la irrigación, lo que da como resultado un estado de hipoxia, esto causará muerte celular y la alteración en la secreción de adipocinas y citocinas pro-inflamatorias, así como la liberación aberrante de ácidos grasos libres (AGL). También se genera estrés oxidativo (EOx), el cual genera la activación de múltiples vías de señalización, incluyendo NF- κ B y JNK-AP1 que pueden influir en la regulación o disfunción del metabolismo y la inflamación. Los AGL y las citocinas proinflamatorias actúan en los tejidos metabólicos, como el tejido hepático y el muscular, modificando la respuesta inflamatoria, así como el metabolismo de los carbohidratos y contribuyendo, por tanto, al desarrollo de síndrome metabólico y mecanismos de resistencia a la insulina (Aleman., 2016., Mosso.,2018)

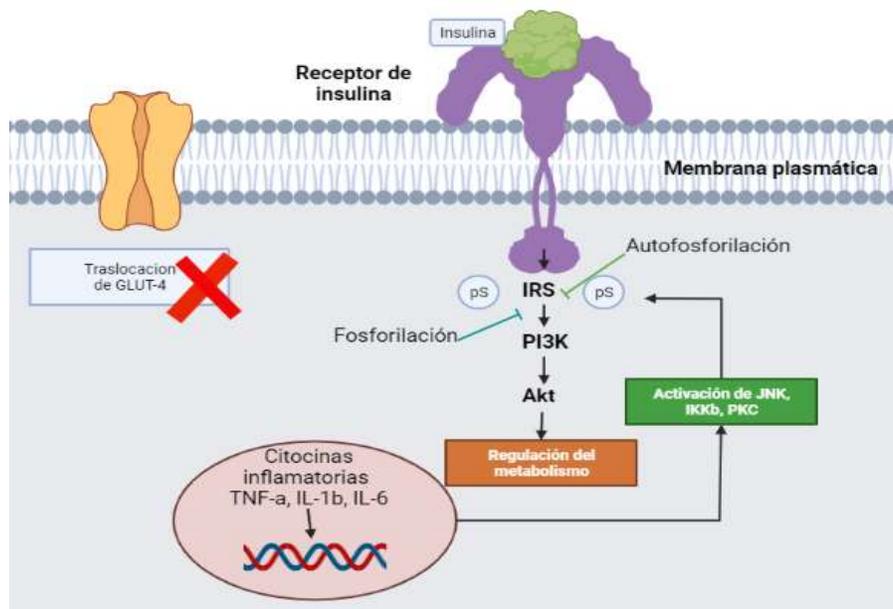


Figura 5. Resistencia a la insulina. Puntos de interferencia de las citocinas en la señalización de la insulina, el TNF- α inhibe la autofosforilación del receptor de la insulina, que fosforila al IRS en serina, por lo que se fosforila el propio receptor en su residuo de serina, evitando el inicio de la cascada de señalización. La IL-6 a través de la activación del SOCS-3 evita la autofosforilación del receptor, por lo que inhibe igualmente la cascada de señales, provocando resistencia a la insulina.



3.2.3 Criterios de diagnóstico de DT-2

Los criterios de diagnóstico contemplan diversos factores de riesgo que favorecen el desarrollo de diabetes, lo que permite identificar desde personas propensas hasta pacientes declaradamente diabéticos. Los factores asociados a esta enfermedad son: antecedentes familiares con este padecimiento, IMC > 23 en mujeres y > 25 en varones, además de obesidad abdominal, y en suma, este grupo de enfermedades va a dar como característica, ciertos signos y síntomas, entre ellos se encuentra la polifagia, poliuria, polidipsia, pérdida de peso, debilidad o fatiga. Los pacientes con diabetes muestran una pérdida de peso de forma inexplicable, también tienen un hambre insaciable y una sed continua y por ende tiene mucha micción, de igual manera existen parámetros que se pueden cuantificar para diagnosticar esta enfermedad como lo son la hiperglucemia, cetoacidosis y glucosuria.

El diagnóstico de diabetes se puede basar en los criterios de la glucosa plasmática, ya sea en el valor de la glucemia en ayunas (GA) o en el de la glucosa plasmática (GP) a las 2 horas durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) de 75 g, o en los criterios de la A1C. La Asociación Americana de Diabetes (ADA) propuso, en el año 2010, los criterios diagnósticos que se muestran en la Tabla 1 (ADA et al., 2019).

Tabla 2. Criterios bioquímicos para el diagnóstico de diabetes tipo 2 (ADA, 2019).

Prueba		Normal	Prediabetes	Diabetes
Hemoglobina Glicosilada (A1C)	Determinar el valor promedio de la glucemia en las últimas 12 semanas.	<5.6 %	5.7-64 %	≥6.5 %
Glucosa Postprandial (GP)	Glucemia 2 h después de los alimentos.	<139 mg/dL	140-19 mg/dL	≥ 200 mg/dL
Glucosa Plasmática en ayunas (FPG)	Glucemia en ayunas.	<9 mg/ dL	100-125 mg/dL	≥ 126 mg/dL



3.2.4 Tratamiento de DT-2

La hiperglucemia persistente es el fenómeno central en todas las formas de diabetes. En este sentido, el tratamiento debe estar encaminado a descender los niveles de glucemia a valores próximos a la normalidad siempre que sea posible. Por lo que el tratamiento de la diabetes comprende estrategias nutricionales como la pérdida de peso, adecuación de fármacos a los hábitos dietéticos y ejercicio físico (Alfaro., 2000).

Tratamiento dietético: Es un pilar fundamental en el manejo de la DT2 y en muchas ocasiones es probablemente la única intervención necesaria. La dieta debe ir orientada hacia la consecución y mantenimiento de un peso aceptable y de unos niveles óptimos de glucosa, lípidos y tensión arterial.

Ejercicio: El ejercicio físico juega un papel muy destacado, aumentando la captación de la glucosa por el músculo, incluso cuando no se disminuye el peso, ayudando a mejorar el control metabólico. Además, actúa de manera favorable sobre otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular como hiperlipidemia y la hipertensión arterial.

Tratamiento farmacológico: Para el tratamiento farmacológico de la DT2 se dispone de insulina en sus distintas presentaciones y de antidiabéticos orales eficaces en controlar la hiperglucemia, incrementar la sensibilidad a la insulina, o reducir la hiperglucemia postprandial que mejoren el síndrome de resistencia a la insulina.

3.2.4.1 Tratamiento farmacológico de DT-2

El manejo terapéutico de la DT-2 ha de ser progresivo. Inicialmente dieta y ejercicio físico son la base, sin embargo, si no se consiguen los objetivos fijados, es necesario añadir un tratamiento farmacológico, el cual se hace necesario cuando las medidas de cambio del estilo de vida no son suficientes para conseguir



los objetivos de control de la glucemia como la elección de fármacos orales hipoglucemiantes y/o insulina con el enfoque centrado en el paciente, lo cual exige que se deban considerar la eficacia, el coste, los posibles efectos secundarios, la potencial ganancia de peso, las comorbilidades asociadas, el riesgo de hipoglucemia y las preferencias del paciente (Alfaro., 2000).

Debido a que el tratamiento de DT2 está dirigido a la reducción de la hiperglucemia y la HbA1c ($\leq 7\%$), para prevenir riesgos cardiovasculares y otros riesgos a largo plazo. Existe una amplia gama de medicamentos que pueden usarse para reducir la glucemia (Tabla 4), siendo mecanismos notables como mejorar la secreción de insulina y reducir la resistencia a la insulina de los tejidos periféricos (Alemán., 2016).

Tabla 3: Clase de medicamentos utilizados para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2.

Clase	Compuestos	Mecanismo	Acción fisiológica
Biguanidas	Metformina	Activa la AMP quinasa	Disminuye la producción de glucosa hepática
Sufonilureas	Glibenclamida Glibenclamida Glipizida Glimepirida	Cierra los canales K-ATP en las membranas plasmáticas de las células β	Aumenta a secreción de insulina
Meglitinidas	Repaglinida Nateglinida	Cierra los canales K-ATP en las membranas plasmáticas de las células β	Aumenta a secreción de insulina
Inhibidores de la α-glucosidasa	Acarbose Miglitol	Inhibe la α -glucosidasa intestinal	Retrasa la digestión/ absorción de carbohidratos intestinales
Inhibidores de DPP4	Sitagliptina Vildagliptina Saxagliptina Linagliptina	Inhibe la actividad DPP4, aumentando la concentración de incretina postprandial GLP1	Aumenta a secreción de insulina y Disminuye la secreción de glucagón
Agonistas del receptor GLP-1	Exenatida Liraglutida Lixisenatida Exenatida LAR dulaglutida.	Activa los receptores GLP-1	Aumenta la secreción de insulina y la saciedad. Disminuye la secreción de glucagón y Ralentiza el vaciado gástrico.
Secuestrantes de ácidos biliares	Colesevelam	Se une a los ácidos biliares en el tracto intestinal, aumentando la producción de ácidos biliares hepáticos.	Disminuye a producción de glucosa hepática y Aumenta los niveles de incretina



❖ **Metformina:**

Es el fármaco de primera elección o de inicio en monoterapia por su eficacia para el tratamiento de pacientes con DT2, debido a su efecto neutro sobre el peso, ausencia de hipoglucemias, su mejora del perfil lipídico, su aceptable tolerancia y su costo económico favorable. Puede utilizarse también en niños > 10 años en monoterapia o combinada con insulina (ADA., 2019).

Mecanismo de acción: disminuye la producción hepática de la glucosa y, en menor grado, aumenta la captación de la glucosa por el músculo e incluso reduce su absorción intestinal. Reduce la HbA1c de 1,5-2 %, sin provocar hipoglucemias (Salazar-Lvarez., 2011).

❖ **Sulfonilureas**

Son fármacos insulinosectores que actúan en receptores específicos de la célula β pancreática, son ácidos débiles, se unen ampliamente a proteínas (> 90%), metabolizadas en el hígado y excretadas a través del riñón o por las heces. Se han de considerar cuando existe intolerancia o contraindicación a la metformina o asociadas a esta, valorando el balance riesgo-beneficio en relación con la eficacia, riesgo de hipoglucemia (Pallardo-Sánchez., 2008).

Mecanismo de acción: Actúan sobre la célula beta pancreática estimulando la liberación de insulina, a través de un canal de potasio ATP dependiente. Pueden disminuir la resistencia periférica a la insulina por lo que pueden provocar hipoglucemias. Reducen la HbA1c en un 1,5-2 % (Aleman., 2016).

❖ **Glinidas (Meglitinidas)**

Las propiedades antidiabéticas e insulino-trópicas de las no sulfonilureas, llamadas meglitinidas fueron descubiertas hace más de 20 años. Los fármacos que pertenecen a este grupo son la repaglinida y la nateglinida. Estos fármacos restauran la primera fase de secreción de insulina disminuyendo la hiperglicemia



postprandial, sin pico hiperglicémico entre las comidas (Santa Cruz., 2002). Mecanismo de acción: Provocan la liberación rápida de la insulina almacenada en la célula beta, restableciendo el máximo de secreción de insulina que se produce inmediatamente tras la ingesta, el mecanismo de acción es muy similar a las sulfonilureas (distinto receptor), con inicio de acción y eliminación más rápidos (4-6 h), con efecto predominante sobre la hiperglucemia postprandial, riesgo de hipoglucemia (con menor duración por su corta acción) e incremento de peso. Reducen la HbA1c entre 0,5-1,5 % (Aleman., 2016).

❖ Pioglitazona

La pioglitazona es una tiazolidinediona, la cual se reconocen por ser el primer grupo farmacológico en demostrar su efecto sensibilizador a la insulina en diversos tejidos, que actúan como ligando selectivo para los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) (González-Ortiz., n.d.)

Mecanismo de acción: Activa los receptores γ activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) incrementando la captación de glucosa por los tejidos y mejorando la sensibilidad a la insulina, sin aumentar su secreción (no produce hipoglucemias). Mejora el perfil lipídico y otros factores de riesgo cardiovascular. Todo ello se traduce en la clínica en una disminución de la glucemia, una disminución de los ácidos grasos libres y triglicéridos, y una redistribución de la grasa corporal (disminución de la grasa abdominal). Puede reducir la HbA1c hasta 1,5 %. Su efecto tarda en observarse de 8-12 semanas. (Aleman., 2016).

❖ Inhibidores alfa-glucosidasas

Los inhibidores de alfa-glucosidasa son: acarbosa, miglitol y vogliobosa, los 2 primeros se encuentran disponibles en el mercado. Se sitúa en segunda línea de tratamiento en combinación con otros fármacos orales o como alternativa a metformina si estuviese contraindicada (Santa Cruz., 2002) Mecanismo de acción: Disminuyen la absorción de los hidratos de carbono en el intestino delgado al inhibir de manera reversible las alfa-glucosidasas, que son necesarias para hidrolizar los polisacáridos a monosacáridos para su absorción,



disminuyendo la hiperglucemia postprandial. Disminuyen la HbA1c un 0,5-0,8 % (Alemán., 2016).

❖ Inhibidores de la DPP-4 y Análogos del GLP-1

Un tipo de tratamiento para DT2 denominado «basado en incretinas», son los análogos de GLP-1 exenatide y liraglutide, y los inhibidores selectivos de la enzima DPP-4 como sitagliptina, vildagliptina y saxagliptina. Estos fármacos producen un incremento de las concentraciones séricas de la hormona GLP-1, de ese modo, promueven una mayor liberación de insulina dependiente de glucosa, inhibiendo la secreción de glucagón y mejorando su captación en tejidos periféricos, además de un aumento de la velocidad de vaciamiento gástrico, con disminución del apetito y la ingesta calórica (González-González., 2011).

Los inhibidores de la DPP-4 evitan la rápida degradación del GLP-1 (bloqueando de forma temporal la DPP-4), prolongando su actividad biológica hasta 16 h. Con ello, aumentan la secreción de insulina mediada por glucosa y suprimen la secreción de glucagón con lo que reducen la producción hepática de glucosa. Reducen la HbA1c un 0,6-0,9 %. Mientras que los análogos de GLP-1 son péptidos con secuencia similar al GLP-1 humano pero que no son inactivados por la enzima DPP-4, por lo que su semivida de eliminación es más larga. (Alemán., 2016).

❖ Insulina

El tratamiento con insulina es necesario en todos los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y en aquellos pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cuyas células β han perdido una parte importante de su capacidad secretora de insulina. La insulino terapia es el tratamiento más efectivo, reduciendo la HbA1c entre el 1,5-3 %. Sin embargo, por causas variadas, es habitual el retraso en la adición de insulina hasta fases muy avanzadas de la enfermedad siendo necesaria la administración exógena de insulina para un buen control glucémico.



3.2.5 Diabetes e Hipertensión Arterial

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos y es actualmente una de las principales causas de muerte alrededor del mundo. Dentro de los factores de riesgo de esta patología se encuentra la diabetes y la hipertensión arterial. Cuando estas patologías coexisten, generan un efecto potenciador de riesgo de complicaciones macro y microvasculares. Hay evidencia epidemiológica extensa que indica que los individuos diabéticos con hipertensión tienen un alto riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, insuficiencia renal y retinopatía diabética (Contreras., 2021).

La hipertensión arterial es el factor de riesgo cardiovascular más prevalente en las personas con diabetes, la prevalencia de la HTA en pacientes con Diabetes conocida es del 83 % y, en aquellos individuos con DM no conocida, del 79 %. A nivel mundial la hipertensión arterial afecta del 20-60% de la población con diabetes y en consecuencia la hipertensión contribuye en el desarrollo y la progresión de las complicaciones crónicas de esta enfermedad. En pacientes con DT2, la HTA puede estar presente en el momento del diagnóstico o incluso antes de presentarse la hiperglucemia que muy a menudo es parte de un síndrome que incluye intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad, dislipidemia y enfermedad arterial coronaria, constituyendo el denominado síndrome X o síndrome metabólico.(Cervantes-Villagrana, Presno-Bernal., 2013), (OMS., 2020)

Por un lado, la diabetes, como factor independiente es una de las enfermedades con un alto aporte para el desarrollo de enfermedad coronaria, con un estimado entre dos y cuatro veces mayor que en relación con la población general, lo que hace que esté relacionado directamente con el 86% de las muertes en personas con diabetes. Del mismo modo, el aumento de la presión arterial sistólica o diastólica a cifras de 5 mmHg se asocia a un aumento en la enfermedad cardiovascular del 20-30% (Araya-Orozco., 2004).

La fisiopatología de hipertensión en diabetes es variada, por ejemplo, en DT2 donde la hipertensión arterial es más frecuente, se desarrolla un estado de



resistencia a la insulina secundario, el cual progresa a un estado de hiperactividad alfa-adrenérgica y vasoconstricción periférica. Lo cual conlleva a un estado de hiperinsulinismo secundario y a una disminución en el aclaramiento de insulina como consecuencia de la deficiente metabolización periférica de glucosa. Este estado es capaz de amentar la presión arterial por diferentes mecanismos, uno de ellos es la hipertrofia del músculo liso vascular secundario a la acción mitogénica de la insulina, la cual es encargada del remodelado vascular, a través de la modificación del transporte de iones en la membrana celular, lo que a su vez genera el incremento de los niveles de calcio citoplásmico de los tejidos vasculares, ocasionando un estado de hiperreactividad vascular a los agentes vasoconstrictores. Un mecanismo alternativo implicado es la retención renal de sodio debida a un aumento en la reabsorción a nivel tubular, lo que aumenta la actividad del sistema simpático. (Sánchez-Kaski., 2014).

Otro papel importante de la insulina es la capacidad de inducir vasodilatación a través del aumento en la síntesis de óxido nítrico, la cual se ve disminuida en estados de insulinoresistencia y de diabetes, probablemente por inactivación del óxido nítrico o por una reducción de la capacidad del endotelio vascular para sintetizarlo (Araya-Orozco., 2004).



3.3 HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA)

3.3.1 Definición y prevalencia de HTA

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica, heterogénea, caracterizada por el aumento de la presión en el interior de las paredes de las arterias, que son grandes vasos por los que circula la sangre en el organismo esto como resultado de la interacción de factores genéticos y factores ambientales lo cual provoca un deterioro de forma progresiva, y se considera que una persona hipertensa cuando su tensión arterial es demasiado elevada con valores superiores ≥ 40 mmHg en PAS y ≥ 90 mmHg en PAD e acuerdo con la norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009. Es conocida como una enfermedad de etiología múltiple, y que además precipita la aparición de enfermedades cardiovasculares y aumenta la morbilidad de estas mismas, las cuales se han convertido en las principales causas de defunción en nuestro país, por lo que se considera un grave problema de salud pública. En México, la prevalencia es de 30.8 % en pacientes ≥ 20 años de edad y solo se diagnostica del 13.4 a 22.7 % y de acuerdo con el estudio FRIMEX en el año 2018, del 100% de los adultos hipertensos el 47,3% desconocía que padecía HTA. Mientras que a nivel mundial, afecta a más del 30% de la población adulta, en donde 1.3 billones de personas padecen esta enfermedad (Castaño., 2011).

3.3.2 Clasificación de HTA

Actualmente la HTA se clasifica en dos tipos dependiendo de la causa que la provoque; en donde el 95% de las hipertensiones que observamos en la clínica no tienen una etiología definida, estas constituyen la llamada hipertensión arterial (HTA) esencial, también denominada primaria o idiopática que puede ser causada por factores como alteraciones en el sistema nervioso simpático, el volumen sanguíneo, gasto cardiaco, las resistencias arteriolas periféricas el sistema



renina-angiotensina-aldosterona, la sensibilidad al sodio y la resistencia a la insulina. Mientras que el 5% son secundarias que es debida a diversas enfermedades las cuales favorecen que exista una cantidad exagerada de líquido en el interior del sistema vascular, o bien porque favorece la contracción de las arterias, reduciendo así la capacidad de contener sangre (Hipertensión arterial (II)) (Mata., 2004).

1. **Hipertensión arterial esencial o idiopática:** Este tipo de HTA es generalmente de causa desconocida. Por lo que probablemente es desencadenada por la combinación de una serie de factores genéticos (hereditarios) y ambientales como lo son la edad avanzada, obesidad, alimentación (dieta rica en sal y baja en calcio y potasio), falta de actividad física, consumo de alcohol, tabaquismo y estrés, son factores que predisponen una tensión arterial elevada y que favorecen el desarrollo de hipertensión arterial.
- 2) **Hipertensión secundaria:** Cuando la causa de la HTA no es esencial, es debida a diversas enfermedades las cuales favorecen que exista una cantidad exagerada de líquido en el interior del sistema vascular, o bien porque favorece la contracción de las arterias, reduciendo así la capacidad de contener sangre. La enfermedad del riñón, enfermedad vascularrenal, coartación de aorta, síndrome de apnea del sueño y enfermedades metabólicas (enfermedad de Cushing, hiperaldosteronismo, feocromocitoma, hipercalcemia, hipertiroidismo e hipotiroidismo, acromegalia), causa neurológica, y diversos medicamentos (corticoides, estrógenos a dosis altas, antidepresivos, descongestivos nasales, anti-inflamatorios, ciclosporina, cocaína, etc.), son enfermedades que con mayor frecuencia producen hipertensión arterial, denominada en estos casos hipertensión secundaria.



3.3.3 Criterios de diagnóstico para HTA

El diagnóstico de esta enfermedad y su tratamiento se basa en una correcta medición de la presión arterial. Así entonces se considera a un paciente como hipertenso cuando presenta repetidamente cifras mayores o iguales a 140/90 mm Hg (Tagle., 2018).

- a) Presión arterial sistólica o máxima (alta). Indica que hay en el interior del circuito coincidiendo con el latido cardiaco. Cuando el corazón mete sangre en el circuito a presión sube mucho.
- b) Presión arterial diastólica o mínima (baja). Es la presión del circuito durante la diástole, el momento en el que el corazón no introduce sangre dentro del circuito.

Según dicha presión arterial el paciente puede tener:

Tabla 4. Clasificación de la HTA de acuerdo a la NOM.030-SSA2-2009

Categoría	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)
Óptima	< 120	< 80
Presión arterial normal	120-129	80-84
Presión arterial fronteriza	130-139	85-89
Hipertensión grado 1 (leve)	140-159	90-99
Hipertensión grado 2 (moderada)	160-179	100-109
Hipertensión grado 3 (grave)	≥ 180	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	< 90

3.3.3.1 Presión sanguínea

El corazón es el órgano encargado de bombear y distribuir la sangre a todo el cuerpo, esto lo hace mediante a una presión elevada de 100 mg Hg de media. La presión sanguínea se define como la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias, la cual está controlada por dos principales factores: el primero es el flujo sanguíneo, que es la cantidad de sangre que pasa por un punto



determinado en la circulación en un periodo dado, en una persona adulta en reposo es de aproximadamente de 5000 mL/min, y en segundo está el gasto cardiaco, que es la cantidad de sangre bombeada por el corazón hacia la aorta cada minuto, está controlada principalmente por la suma de todos los flujos tisulares locales (Hall., 2015).

En general, la presión arterial está controlada de forma independiente por el flujo sanguíneo local o por el gasto cardiaco. La presión arterial tiene un bombeo cardiaco pulsátil, que fluctúa entre una presión sistólica de 120 mm Hg y una presión diastólica de 80 mm Hg. La presión sistólica es a presión de la sangre en la arteria cuando se contrae el corazón. Es la cifra superior (y más alta) en una medición de la presión arterial, mientras que la presión diastólica es la presión de la sangre en la arteria cuando el corazón se relaja entre latidos. Es la cifra inferior (y más baja) en una medición de la presión arterial. Sin embargo, a medida que la sangre fluye por la circulación sistémica, su presión se reduce de forma progresiva hasta aproximadamente 0 mm Hg en el momento en que alcanza la desembocadura de las venas cavas en la aurícula derecha del corazón (Hall., 2015).

El sistema circulatorio tiene un buen control de la presión arterial. Las señales nerviosas aumentan específicamente la fuerza de bombeo del corazón, contraen grandes depósitos para suministrar más sangre al corazón y la contracción completa de más arterias pequeñas en todo el cuerpo, acumulando así más sangre en la gran rama arterial. Es importante recalcar que el flujo sanguíneo que llega a los tejidos del cuerpo está siempre controlado de una forma muy precisa de acuerdo a los requerimientos de estos, por ejemplo, cuando los tejidos se encuentran activos, requieren mucho más flujo sanguíneo porque sus necesidades aumentan a diferencia de cuando se encuentran en reposo (hasta 20 o 30 veces). Sin embargo el corazón normalmente no puede aumentar su gasto cardiaco más de cuatro a siete veces, esto significa que no es suficiente con aumentar el flujo sanguíneo en todas las partes del cuerpo cuando un tejido en particular demanda un mayor flujo, y para compensar esto, el los micro vasos de cada tejido deben



controlar de forma muy constante las necesidades tisulares, como la disponibilidad del oxígeno y nutrientes así como también la acumulación productos de desecho como el de dióxido de carbono. De forma que estos a su vez deberán actuar directamente sobre los vasos sanguíneos locales, dilatándolo o constriñéndolos, controlando de forma precisa el flujo sanguíneo local a nivel local requerido para la actividad local, así como también el control nervioso que suma al control del flujo sanguíneo tisular, como el aumento específicamente de la fuerza del bombeo del corazón, la contracción de los grandes reservorios venosos para proporcionar más sangre al corazón y una contracción generalizada de una mayor parte de las arteriolas de todo el cuerpo (Hall., 2015). Adicionalmente durante un período más largo de tiempo, horas y días, los riñones desempeñarán un papel adicional importante en el control de la presión al secretar hormonas que controlan y regulan el volumen sanguíneo.

3.3.3.2 Flujo y Resistencia Vascular

La función fisiológica del sistema circulatorio es satisfacer las necesidades de los diferentes tejidos, en general, la función del sistema circulatorio es mantener un ambiente adecuado, es decir, transportar sangre a todo el cuerpo y suministrar de oxígeno, nutrientes, electrolitos, eliminar los desechos y conducir hormonas de una parte del cuerpo a otra para una adecuada homeostasis y mantener las funciones adecuadas de las células. El sistema circulatorio o sistema vascular, es un sistema cerrado, conformado por arterias, venas, arteriolas y capilares que forman una gran red, el cual comienza y termina en el corazón. Es importante destacar las funciones globales que desempeñan algunos componentes de sistema circulatorio, y la relación directa entre presión, flujo y resistencia (Guyton., 2009) (figura 6).

Arterias: Son vasos sanguíneos que transportan la sangre oxigenada a una presión elevada desde el corazón hasta el resto del cuerpo con mucha rapidez, es por ello que las arterias poseen paredes vasculares gruesas y muy fuertes con fibras elásticas que le confieren una estructura dinámica permitiendo su constricción y su relajación para ajustar la presión sanguínea.



Arteriolas: Son las ultimas ramas del sistema arterial, y por ende son el punto de unión entre arterias y capilares que regulan la cantidad de sangre que pasa a capilares, esto es debido a que estos vasos sanguíneos tiene una fuerte pared muscular que puede cerrar la arteriola por completo o dilatarla varias veces, lo que le da la capacidad de alterar el flujo sanguíneo que llega a los capilares en respuesta a las necesidades de los tejidos.

Venas: Están constituidas por células musculares que forman paredes muy delgadas con la capacidad de dilatarse y contraerse a pesar de que la presión de la sangre en el sistema venoso es muy baja; Estas actúan como conductos de transporte de la sangre desde los tejidos hasta el corazón, sirviendo como reservorio fundamental de la sangre.

Capilares: Está compuesta por una fina capa de células endoteliales rodeada por una membrana basal muy delgada que posee numerosos poros capilares diminutos permeables al agua y otras moléculas. Su función es intercambiar líquidos, nutrientes, electrolitos hormonas y otras sustancias entre la sangre y el líquido intersticial.

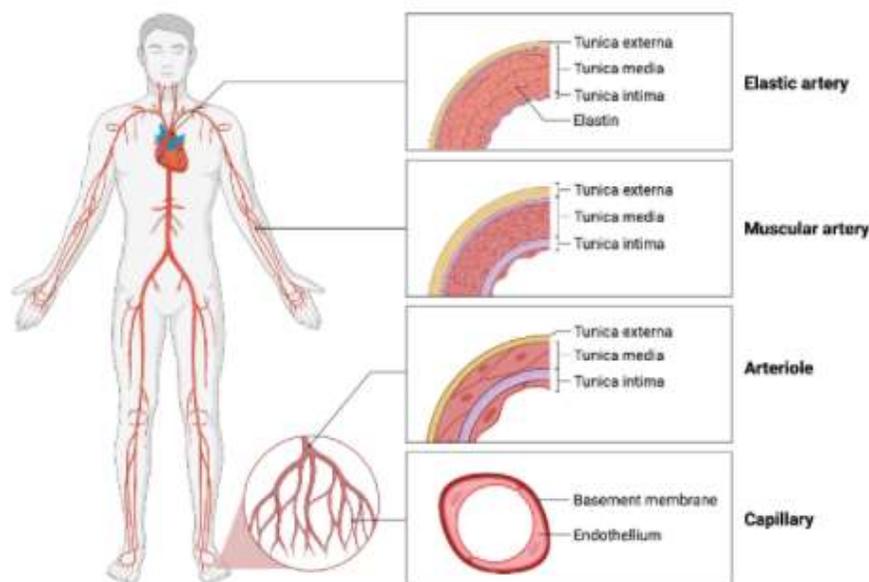


Figura 6. Principales venas y arterias del sistema circulatorio y su conformación.



La circulación se divide en circulación sistémica (la aorta) y circulación pulmonar (tronco pulmonar). Debido a que la circulación sistémica proporciona flujo sanguíneo a todos los tejidos del cuerpo excepto a los pulmones, también se le llama circulación periférica o circulación general, este tipo de circulación está presente a una de las arterias principales: la aorta, que es un vaso sanguíneo grueso que sale del ventrículo izquierdo del corazón, del cual se originan las arterias que van del cuello, cabeza y miembros superiores, la cual desciende también a lo largo de la columna vertebral por la cavidad torácica y abdomen, terminando en las dos arterias ilíacas que van a los miembros inferiores. Al pasar por cada cavidad del cuerpo se subdivide para suplir distintos órganos (Figura 5) (Tortora., 2013).

Todos los vasos sanguíneos tienen una pared integrada por tres capas (figura 6), la primera, formada por endotelio vascular es la **túnica íntima**, que está en contacto directo con la sangre, posteriormente le sigue la **túnica media** que tiene un sistema efector de la contracción y relajación vascular, está formada por células del músculo liso vascular (CMLV) y una lámina de tejido conectivo. Por último, la **túnica externa**, encargada de proveer resistencia, formada por una capa de tejido conectivo con muchas fibras de elastina y colágeno. Los vasos sanguíneos son capaces de ser muy elásticos con la funcionalidad de expandirse al momento de pasar cierta cantidad de sangre, es decir, cuando el corazón bombea sangre a todo el organismo. (Tortora., 2013).

3.3.3.3 Fisiología de la Presión.

La hipertensión arterial conlleva una serie de procesos fisiológicos, químicos y moleculares que es importante comprender, desde el funcionamiento de las células musculares encargadas de la contracción hasta el mecanismo y las moléculas involucradas en cada parte del proceso y parte de la enfermedad.

El sarcolema, presente en la mayor parte de los músculos, es la membrana celular de la fibra muscular y esta inervada por una terminación nerviosa. Su composición física se basa en una membrana celular verdadera, denominada membrana



plasmática, y por una cubierta exterior formada por una capa fina compuesta por numerosas fibrillas de colágeno. Cada fibra muscular contiene varios centenares y millares de miofibrillas, y cada miofibrilla contiene a su vez grandes moléculas proteicas polimerizadas responsables de la contracción muscular, estas moléculas son denominadas: actina y miosina que se encuentran parcialmente intercaladas, lo que hace que las miofibrillas se encuentren suspendidas en una matriz denominada sarcoplásma, el cual a su vez contiene grandes cantidades de potasio, magnesio y fosfato, además de diversas enzimas proteicas, y un extenso retículo sarcoplásmico, el cual posee una organización especial, extremadamente importante para el control de la contracción muscular.

El músculo liso se distingue en dos tipos principales:

- a) Músculo liso unitario: Conformado por una masa de cientos a millares de fibras musculares con la capacidad de contraerse juntas como una sola unidad.
- b) Músculo liso multi-unitario: compuesto de fibras musculares lisas separadas, es decir que cada fibra opera de manera independiente y con frecuencia es inervada por una única terminación nerviosa como ocurre en las fibras musculares esqueléticas. Su característica más importante es que cada fibra, puede contraerse independientemente del resto, y el control se ejerce principalmente por señales nerviosas. Algunos ejemplos del músculo liso multi-unitario son el músculo ciliar del ojo, el iris del ojo y los músculos piloerectores que causan el erizamiento de los pelos cuando son estimulados por el sistema nervioso simpático.

3.3.3.3.1 Músculo liso (ML)

Las células musculares lisas conforman las paredes de muchos órganos huecos en el organismo, incluyendo los vasos sanguíneos, vías aéreas, estómago, intestino, entre otros; Este tipo de células son muy características debido a que carecen del patrón estriado en bandas que se observa en el músculo cardíaco y el esquelético, además de que reciben inervación neuronal del sistema nervioso



autónomo. El fenotipo contráctil del músculo liso está regulado por hormonas, capaces de actuar mediante mecanismos autocrinos o paracrinos, así como señales físicas y químicas locales. Cuando el ML se contrae, impulsan el contenido de los órganos, generando una variación en el diámetro de los tubos o vasos sanguíneos, regulando el flujo contenido en su interior (Federico-Miatello., 2013).

3.3.3.3.2 Musculatura vascular lisa (CMLV)

Las células del CMLV pueden desarrollar contracciones tónicas y fásicas en respuesta a cambios en la carga o longitud. Esto es debido a que poseen estructuras contráctiles como los filamentos finos formados por polímeros de actina globular y filamentos gruesos formados por miosina, por lo que independientemente del estímulo, estas células utilizan la interacción actina-miosina, que cuando son activados, le confieren a la célula la propiedad de contraerse para desarrollar la fuerza en el músculo liso vascular, lo cual será esencial para la regulación normal del flujo sanguíneo y la presión (Fisher., 2010). El proceso de contractibilidad del CMLV esta mediado por una amplia gama de eventos, entre ellos la amplia inervación del sistema nervioso autónomo (SNA), hormonas (agentes autocrinos y paracrinos), procesos bioquímicos, entre otras señales que general la activación de receptores específicos o algún estímulo modificación mecánico (estiramiento), donde iones de calcio son responsables del inicio de la contracción. Cambios en el potencial de membrana, provocados por la suma de disparos de potenciales de acción o por la activación de canales iónicos en la membrana plasmática, pueden también generar la contracción en las células del músculo liso. Dichos canales iónicos sirven como vía de transporte de iones Ca^{2+} desde el espacio extracelular al interior de la célula, lo cual aumenta aún más la concentración intracelular de Ca^{2+} por la liberación desde el retículo sarcoplásmico, formando un complejo con la calmodulina, lo que genera la activación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y esto a su vez fosforila la cadena ligera de miosina (MLC) logando de esta manera la unión de



actina con miosina, lo cual, resulta en un ciclo de entre cruzamiento de ambas proteínas responsables de la contracción.

Diversos agonistas (norepinefrina, angiotensina II, endotelina, etc) capaces de unirse a receptores acoplados a proteína G heterotrimerica, estimulan la actividad de la fosfolipasa C, que es una enzima catalizadora, que a partir del lípido de membrana: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, la formación de dos segundos mensajeros: trifosfato de inositol (IP3) y diacilglicerol (DG) La unión de IP3 a los receptores en el retículo sarcoplásmico provoca la liberación de Ca^{2+} en el citosol. DG, junto con Ca^{2+} , activa a la proteína kinasa C (PKC), que fosforila las proteínas diana específicas. Por otra parte, canales de Ca^{2+} tipo L operados por voltaje en la membrana también se abren en respuesta a la despolarización de la membrana provocada por estiramiento de la CMLV (Federico-Miatello, 2013).

3.3.3.4 Mecanismo general de contracción muscular

De manera general, cuando un agonista (neurotransmisor u hormona), inicia el proceso de la contracción muscular del CMLV, se lleva a cabo una serie de procesos secuenciados a partir de la unión neuromuscular a receptores específicos. Este proceso tiene inicio con un estímulo proveniente de una neurona que emitirá la señal necesaria a lo largo del axón hasta sus terminaciones en las fibras musculares provocando un potencial de acción unidireccional en donde será secretado por el nervio, un neurotransmisor excitatorio (noradrenalina y acetilcolina, principalmente) que se unirá rápidamente a un receptor específico generando la apertura de canales presentes en la membrana, este proceso tiene como propósito la entrada de grandes cantidades de iones sodio (Na^+) y en algunos casos iones calcio (Ca^{2+}), estos ingresan en el interior de la membrana de la fibra muscular, provocando al mismo tiempo la liberación de iones potasio (K^+), generando un cambio en el potencial de acción en el músculo liso; este potencial de acción viaja a lo largo de la membrana de la fibra muscular, despolariza la membrana de la fibra muscular y gran parte de la electricidad del potencial de acción también se propaga en profundidad dentro de la fibra muscular, donde provoca la liberación de Ca^{2+} almacenadas en el retículo sarcoplásmico. El Ca^{2+}



que ha sido liberado será el responsable de iniciar el proceso de unión de actina y miosina provocando el proceso de contracción.

La relajación del músculo liso se produce ya sea como resultado de la eliminación del estímulo contráctil o por la acción directa de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil, algunos agonistas de estos canales se unen a diferentes receptores sobre la proteína del canal e inhiben la entrada de Ca^{2+} en el músculo liso (Federico-Miatello, 2013). Sin embargo, independientemente del proceso de relajación y una vez que este proceso ha iniciado, y el ion permaneció el tiempo requerido, los iones Ca^{2+} son transportados nuevamente al interior del retículo sarcoplásmico y a la mitocondria por la bomba de calcio ATPasa (SERCA), en donde permanecerán almacenados hasta el próximo potencial de acción al músculo. Esta retirada de Ca^{2+} de las miofibrillas disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} provocando la relajación de CMLV y hace que el proceso de contracción muscular termine (Guyton., 2009).

3.3.4 Tratamiento de HTA

La hipertensión arterial es la patología cardiovascular más frecuente en el mundo y el mayor riesgo cardiovascular; que exige el cumplimiento del tratamiento de una manera permanente y sistemática e implica cambios en el estilo de vida con la debida o no toma de fármacos. Tanto el tratamiento farmacológico como el no farmacológico constituyen las herramientas primarias para su control.

El control no farmacológico incluye las recomendaciones que modifican los hábitos de alimentación, control de peso, actividad física diaria, consumo de sal, consumo de alcohol, tabaquismo, manejo de presiones y conflictos de la vida diaria. Mientras que tratamiento farmacológico reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular y muerte, por lo que debe iniciarse de inmediato después de haber establecido un diagnóstico. Sin embargo, en la mayoría de los casos, en las medidas farmacológicas, existe controversia sobre qué grupo de fármacos debe ser la primera opción, y la atención debe centrarse en los eventos importantes de la terapia antihipertensiva, por lo cual, el tratamiento debe iniciarse con un solo



fármaco, por un lado debe ajustarse la dosis completa para lograr el objetivo de reducción de la presión arterial, por otro lado, para lograr una reducción suficiente de la presión arterial, la mayoría de los pacientes necesitan utilizar más de un fármaco antihipertensivo en combinación.

Se sabe que solo del 20 al 30 % de la población hipertensa logra controlar su tensión arterial nada más con un medicamento. La mayoría de los pacientes lo hace con dos o tres medicamentos. La combinación de ellos está orientada a las características clínicas y a la comorbilidad del paciente hipertenso (Tabla 6) (Castaño., 2011). Los principales grupos de fármacos para el tratamiento de la hipertensión se dividen en 6 grupos según su mecanismo de acción: diuréticos, bloqueadores, fármacos β -adrenérgicos, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), bloqueadores de los receptores de angiotensina II (AIIIRA) y bloqueadores α -adrenérgicos (Tabla 5) .

Tabla 5. Fármacos de primera elección para el tratamiento de la Hipertensión Arterial (Cruz T. et al., 2019)

CLASE	FARMACO	EFECTO FARMACOLOGICO
Diuréticos Tiazidas	Hidroclorotiazida	Bloquea al transportador de Na ⁺ /Cl ⁻ en el túbulo contorneado distal renal.
Diuréticos de asa		Bloquea al transportador de Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ renal en el asa de Henle
Espironolactona/Eplerenona	Furosemida	Antagoniza al receptor de aldosterona en el túbulo colector renal
β-bloqueadores	Metoprolol Propranolol	Antagonizan a receptores β 1
IECA (Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina)	Captopril Enalapril	Disminuyen la resistencia periférica al inhibir la ECA y no producir angiotensina II y el volumen sanguíneo al disminuir la secreción de aldosterona.
ARA-II (Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II)	Candesartán Losartán Telmisartán Valsartán	Antagonistas de los receptores AT1 para angiotensina II
Bloqueadores de canales de Ca²⁺ (No Dihidropiridínicos)	Diltiazem Verapamilo	Inhibe el flujo del Ca ²⁺ extracelular al bloquear canales de Ca ²⁺ tipo L de la membrana celular
Bloqueadores de canales de Ca²⁺ (Dihidropiridínicos)	Nifedipina Amlodipina Felodipina Felodipina	Bloqueo de canales de Ca ²⁺



4. Justificación



La diabetes y la hipertensión se han convertido en un reto debido al impacto importante en la salud a nivel mundial. En México, el número de personas que padecen estas patologías se ha incrementado de manera exponencial.

Es por ello que la búsqueda de alternativas terapéuticas novedosas que traten de manera integral las enfermedades relacionadas como la diabetes y la hipertensión es una necesidad imperante en la actualidad. Así, en el presente proyecto se determina la eficacia terapéutica y la seguridad de *E. heterophyllum* en modelos murinos de diabetes e hipertensión arterial con el fin de establecer una alternativa terapéutica novedosa con compuestos bioactivos para el tratamiento de estas patologías.



5. *Hipótesis*



Eryngium heterophyllum mostrará efectos antihipertensivo, antidiabético y antihiperlipidémico en modelos murinos.



6. Objetivo

general



Determinar los efectos antihipertensivo, antidiabético, antihiperlipidémico y toxicológico de *E. heterophyllum* desde el punto de vista funcional, bioquímico y molecular en modelos experimentales.



7. Objetivos específicos



- 1) Obtener los extractos orgánicos (Hexánico, Diclorometánico y Metanólico) del material vegetal.
- 2) Determinar la eficacia antidiabética y antidislipidémica de los extractos de *E. heterophyllum* a través de un modelo murino de diabetes no insulino dependiente de forma aguda y subaguda.
- 3) Determinar el efecto vasorrelajante de los extractos de *E. heterophyllum* en un modelo *ex vivo* de aorta de rata.
- 4) Evaluar los efectos antihipertensivos en ratas SHR y antidiabéticos subagudos del extracto más activo en los modelos murinos establecidos.
- 5) Analizar la expresión de genes relacionados con las complicaciones inducidas por la diabetes, las dislipidemias y la hipertensión en los animales tratados y sin tratar con las muestras de prueba.
- 6) Realizar estudios de toxicidad aguda y subcrónica del extracto con mayor actividad farmacológica de *E. heterophyllum* en modelos murinos.



8. Metodología



Esquema General de la Metodología

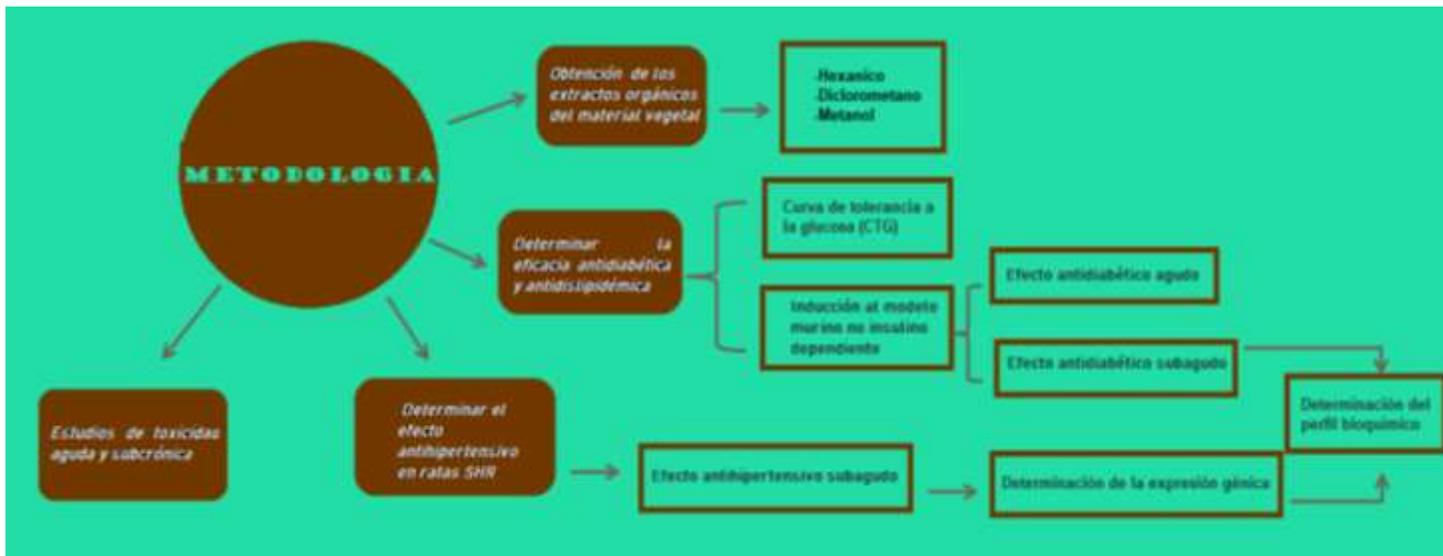


Figura 7. Esquema general de la metodología empleada para la evaluación de los efectos antidiabéticos, antihipertensivos y toxicológicos de los extractos obtenidos de *E. heterophyllum*.

8.1 Material vegetal y obtención de extractos orgánicos de *E. heterophyllum*

La obtención de la planta medicinal *E. heterophyllum* fue adquirida comercialmente en el estado de Chiapas, por el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto. Adicionalmente, con fines experimentales para comparar si había una variación en la eficacia y el efecto de la planta, se adquirió comercialmente una segunda colecta en el Estado de Morelos.

Se llevó a cabo la obtención de extractos orgánicos del material vegetal, realizando en primera instancia una molienda de 450 g del material vegetal en un molino mecánico (High-speed Multifunction GRINDER^{CE}), y posteriormente, se llevó a cabo una maceración exhaustiva de la planta *E. heterophyllum* con 1.5 L de disolvente de acuerdo al orden de polaridad (hexano, diclorometano y metanol) por triplicado cada 72 h. Una vez transcurrido ese tiempo se llevó a cabo una filtración del disolvente y se concentró al vacío con ayuda de un rota evaporador marca BUCHI® para obtención de cada uno de los extractos (hexánico, diclorometánico y metanólico).



8.2 Evaluación farmacológica en modelo *ex vivo*

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo con la Regulación Federal para el Manejo y Experimentación de Animales emitida por la Secretaría de Agricultura y Recursos Naturales (NOM-062-ZOO-1999) aprobada por el Comité Universitario de Usos y Manejo de Animales de la Fundación Autónoma Universitaria de las Américas.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de aproximadamente 250-300g de peso, en condiciones de bioterio, con libre acceso a alimento Rodent Labs Chow® y agua limpia. Las ratas fueron sacrificadas en una cámara con exceso de éter etílico para posteriormente realizar una disección en la parte del cuello y tórax con el fin de obtener la aorta de manera cuidadosa para evitar dañar el tejido. La aorta fue liberada del tejido conectivo y finalmente, esta se cortó en segmentos de 4-5 milímetros de longitud, los cuales fueron colocados en una cámara de incubación con 10 ml de solución de Krebs (NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, EDTA 0.026 mM, glucosa 11.1 mM y CaCl₂ 2.5 mM) a 37°C, pH de 7.4 y constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (95:5). Para evaluar el efecto de las muestras de prueba se utilizó un equipo de registro isométrico vertical para tejido aislado, en donde los anillos de aorta de rata se sujetan a la parte inferior de la cámara y a un transductor de fuerza isométrico vertical modelo Grass FT03® conectado a un polígrafo digital BIOPAC®, en donde el tejido se sometió a una tensión basal de 3 g.

El tejido fue sensibilizado con NA (0.1 μM) tres veces a intervalos de 30 minutos, con un periodo de lavado con solución de Krebs después de cada sensibilización y antes de realizar la evaluación de las muestras de prueba. La presencia o ausencia de endotelio en cada tejido fue confirmada al aplicar carbacol (1 μM) después de la última sensibilización con NA, los anillos de aorta que mostraron relajación se consideraron con el endotelio íntegro. Finalmente, para determinar el efecto vasorrelajante de las muestras de prueba, se realizó una tercera contracción con NA (0.1 μM) de cada fragmento de aorta de rata, los cuales fueron puestos a prueba agregando de forma acumulativa y por separado cada uno de



los extractos obtenidos de la planta *E. heterophyllum* (Figura 8) por medio de la construcción de curvas concentración-respuesta con la finalidad de determinar la eficacia y potencia mediante la medición del efecto relajante máximo (Emax) y la concentración inhibitoria media (CE₅₀) con la ayuda del software Acknowledge (BIOPAC®) y Origin 8.0®.

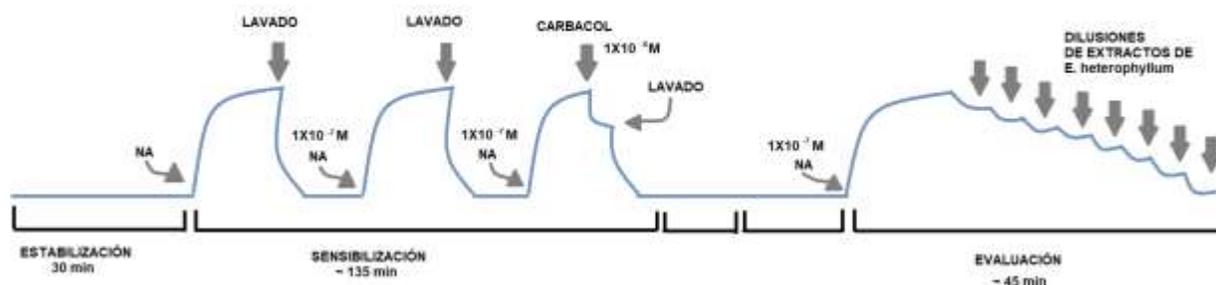


Figura 8. Esquema de la evaluación del efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de *E. heterophyllum*.

8.2.1 Determinación del mecanismo de acción del extracto más activo

8.2.1.1 Participación de los canales de calcio en la contracción inducida por KCl.

Con el propósito de determinar si el efecto vasorrelajante que mostró el tejido estaba siendo inducido por un posible bloqueo de canales de calcio, con la posible hiperpolarización de la membrana y la movilización de Ca²⁺ para ejercer su efecto vasorrelajante, se realizaron nuevamente curvas de concentración respuesta, comenzando con el periodo de equilibrio y sensibilización, los anillos de aorta de rata fueron contraídos con KCl 80 mM, para posteriormente, agregar de manera acumulativa del diluciones del extracto de *E. heterophyllum* con mayor efecto vasorrelajante (extracto hexánico) determinado en los ensayos previos (Figura 9).

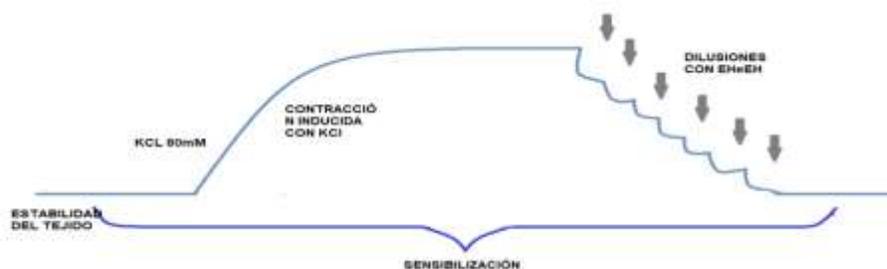


Figura 9. Esquema de la evaluación del efecto vasorrelajante sobre la contracción inducida con KCL 80 mM.

8.2.1.2 Participación de los canales de Ca^{2+}

Con el objetivo de determinar si el mecanismo del efecto vasorrelajante producido por el extracto está relacionado con el impedimento del influjo de Ca^{2+} hacia el interior de las células del músculo liso, realizamos una nueva curva de concentración-respuesta con anillos de aorta de rata sin endotelio, en la cual, después de un periodo de equilibrio y sensibilización, los anillos fueron lavados con solución de Krebs 80 mM libre de Ca^{2+} durante 15 min para posteriormente agregar $CaCl_2$ (80 μ M a 27 mM) de forma acumulativa a la cámara de incubación. De igual manera se pre-incubaron durante 15 min a la CE_{50} del extracto hexánico de *E. heterophyllum* [490 μ g/mL]. Finalmente se agregó de manera acumulativa $CaCl_2$ (80 μ M a 27 mM) (Figura 10).



Figura 10. Esquema de la evaluación del efecto vasorrelajante sobre la contracción inducida con concentraciones acumulativas $CaCl_2$.



8.3 Modelo antihipertensivo agudo

Para la determinación del efecto antihipertensivo, se formaron dos grupos de experimentación con ratas SHR, el primer grupo de experimentación fue administrado vía intra-gástrica (i.g) con el vehículo (tween 80 al 10%), el segundo grupo fue administrado con el extracto hexánico de *E. Heterophyllum* (312 mg/kg) y utilizamos un tercer grupo de ratas Wistar Kioto, las cuales fueron tomadas como grupo control normotenso. Durante el transcurso del ensayo se tomaron los registros a la hora 0, 1, 3, 5 y 7 horas, de presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) mediante un método no invasivo con un pletismógrafo "tail-cuff" (Panlab s.l.u LE5007, Harvard Apparatus® programa Chart V4.2 de Powerlab ADInstruments®) (Hernández et al., 2013), se tomaron los promedios de 10 lecturas de presión para cada animal posterior a la administración y se compararon con los valores de presión de los animales normales.

8.4 Determinación del efecto antihiper glucémico y antidiabético

8.4.1 Curva de tolerancia a glucosa (CTG)

Se utilizaron ratas macho normoglucémicas de la cepa Wistar, las cuales fueron puestas en ayuno 16 horas previas, se pesaron, y se les midió la glucosa (T0) antes de comenzar el ensayo que fue registrada como glucosa basal (G0), se formaron 3 grupos(n=6): vehículo (1), control (2) y extracto (3). Cada grupo de experimentación fue administrado vía oral con una carga de glucosa disuelta en agua (2 g/kg); 15 minutos antes, al grupo 1 se le administró el vehículo tween 80 al 10 %, el segundo grupo fue administrado con glibenclamida (10 mg/kg) y finalmente el tercer grupo fue administrado con 100 mg/kg de los extractos de *E. heterophyllum*. Finalmente se llevó a cabo el registro de glucemia en sangre en intervalos de tiempo 0.5, 1, 2, y 3 horas.



8.4.2 Inducción al modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente

Posterior a la CTG, se evaluó el extracto con mayor actividad. Se llevó a cabo la inducción al modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente a ratas macho de la cepa Wistar utilizando el protocolo ya establecido por Ortiz-Andrade et al., 2008, el cual consiste en la administración intraperitoneal (i.p.) de 110 mg/Kg de nicotinamida y 65 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). Una vez transcurridos de 10-15 días, se llevó a cabo el registro de glucemia en sangre obteniendo valores > 150 mg/dL, las ratas que presentaban estos valores fueron seleccionadas para los experimentos posteriores.

8.4.2.1 Ensayo antidiabético agudo

Una vez obtenido el modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente, se formaron 3 grupos de experimentación, los cuales fueron puestos en ayuno 16 horas previas al inicio del ensayo, y una vez transcurrido el tiempo establecido (T0) se les midió la glucosa basal (G0), los animales fueron administrados vía intra-gástrica (i.g.) en donde el primer grupo fue administrado con el vehículo (tween 80 al 10%), el segundo grupo fue administrado con glibenclamida (5 mg/kg) y al tercer grupo se le administró 100 mg/kg de extracto de hexánico de *E. heterophyllum*. La glucemia sanguínea fue medida en intervalos de tiempo de 1, 2, 3, 5 y 7 horas, posterior a la administración.

8.4.2.2 Ensayo antidiabético sub-agudo

Para el ensayo sub agudo utilizamos de igual forma un modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente, se formaron 4 grupos de experimentación (n=6), el grupo 1 fue administrado i.g. con el vehículo (tween 80 al 10%), el segundo grupo (grupo control positivo) fue administrado con metformina (120 mg/kg), al tercer grupo se le administró 100 mg/kg de extracto hexánico de *E. heterophyllum* y el cuarto grupo fue formado con ratas normoglucémicas el cual fue administrado con agua. Las ratas se mantuvieron en condiciones de bioterio con comida y agua ilimitada, y fueron administradas durante 15 días a una dosis diaria. Los niveles



plasmáticos de glucosa se midieron antes de la administración diaria (T0) y después de la administración (T5) durante diferentes días del periodo de tratamiento (1, 3, 6, 9, 12 y 15 días).

8.4.2.2.1 Determinación del perfil bioquímico

Al término del periodo de administración diaria, los animales fueron sacrificados al día 16, por lo que se procedió a anestesiarse a las ratas con 40 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intra-peritoneal (i.p.) (Diario Oficial de la Federación Mexicana 1999, Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999), y a través de una punción cardíaca se extrajo la sangre colocándola en tubos correctamente etiquetados sin anticoagulante, se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min con el fin de separar el suero sanguíneo para llevar a cabo la determinación de los niveles plasmáticos de glucosa y los diferentes parámetros bioquímicos: colesterol, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL.

8.5 Estudios toxicológicos

De acuerdo a la guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 2001) Se llevaron a cabo ensayos de toxicidad aguda y subcrónica del extracto hexánico de *E. Heterophyllum*, con el propósito de determinar el potencial de letalidad del extracto a diferentes dosis, y establecer si dicho extracto pudiera generar daño en los principales órganos metabolizadores y vitales para el animal (Hígado, riñón, corazón y pulmón).

8.5.1 Evaluación toxicológica aguda

Los ensayos se llevaron a cabo empleando ratones machos de la cepa CD1, los cuales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos (n=3), estos fueron puestos en ayuno durante 16 hrs. previas a iniciar el ensayo. Posteriormente, los animales fueron administrados vía intra-gástrica (i.g.) a las dosis de prueba de 5, 50, 300 y 2000 mg/Kg del extracto de *E. Heterophyllum*, respectivamente. El vehículo



empleado fue el tween 80 al 10%. Cada grupo se mantuvo en observación y monitoreó 24 horas post administración, una vez transcurrido el tiempo establecido se determinó el número de defunciones, y finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto de *E. Heterophyllum* fue categorizado según a lo establecido por la SGA (SGA, 2011).

8.5.2 Evaluación toxicológica subcrónica

Se formaron aleatoriamente dos grupos de ratones (n=8), el grupo 1 fue administrado vía i.g. con el extracto hexánico de *E. Heterophyllum* a una dosis de 100 mg/Kg; y el grupo 2 correspondió al grupo vehículo administrado vía i.g. con Tween 80 al 10%. Ambos grupos fueron administrados durante 28 días bajo las mismas condiciones y a la misma hora. Durante todo el experimento los animales se mantuvieron en observación y monitoreo con el propósito de observar posibles variaciones en el peso de los animales como resultado de la administración del extracto, por lo que estos fueron pesados al inicio, durante y al finalizar el experimento, y por último determinamos la diferencia de peso de cada ratón.

Finalmente al día 29, se llevó a cabo la eutanasia de los animales respetando las normas éticas establecidas, los cuales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (0.1 ml/Kg) y se tomó una muestra de sangre de cada animal mediante punción cardiaca para determinar los parámetros bioquímicos relacionados con posible daño hepático y cardiaco por medio de la cuantificación de la enzima AST (Aspartato Aminotransferasas) y ALT (Alanino Aminotransferasas). La determinación de los parámetros bioquímicos se llevó a cabo en colaboración de la Bióloga Elideth del Centro Médico Universitario UAEM.

Por otro lado, se realizó la extracción de los siguientes órganos: hígado, riñón, corazón y pulmón, a los cuales se les determinó el peso relativo empleando la siguiente ecuación:

Peso del órgano x100= Peso relativo (%) / Peso total del ratón a los 29 días



Una vez determinado el peso relativo, los órganos fueron lavados con solución salina y conservados en alcohol absoluto para su análisis histológico con la finalidad de observar posibles cambios a nivel celular de los diferentes grupos del estudio y poder ser comparados. Los tejidos disectados se fijaron en alcohol absoluto, y posteriormente, para su aclarado se colocó en una solución acuosa de xilol; se incluyeron en parafina y una vez obtenidos los bloques se hicieron cortes de los tejidos en un micrótopo con un grosor de 4 μ M, se colocaron sobre un portaobjetos y fueron teñidos con hematoxilina en agua, y debido a que el colorante de eosina es más soluble en alcohol que en agua, se vuelve a deshidratar la muestra a través de una serie de soluciones alcohólicas de concentración creciente, y posterior a esto, se tiñe con eosina en alcohol, al finalizar la muestra se pasa por xilol y se coloca un medio de montaje y un cubreobjetos. Finalmente, todas las secciones teñidas fueron examinadas utilizando un microscopio de luz marca Zeiss con un aumento de 10, 20 y 40X. La técnica de tinción se realizó en colaboración del laboratorio de histología del INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias).

8.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la parte *ex vivo* se expresan como la media de 5 animales \pm el error estándar de la media. Las curvas de concentración respuesta se realizaron con ayuda del programa Origin 8.0., mientras que para el análisis estadístico utilizamos el programa Graph Pad Prism 5, estableciendo una diferencia significativa de las medias de $p < 0.05$ mediante un análisis de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Bonferroni.

Para el análisis estadístico de la expresión relativa de RT-PCR se empleó el programa GraphPad Prism v.5.0, con un análisis estadístico tukey $*p < 0.05$.



9. Resultados y discusión



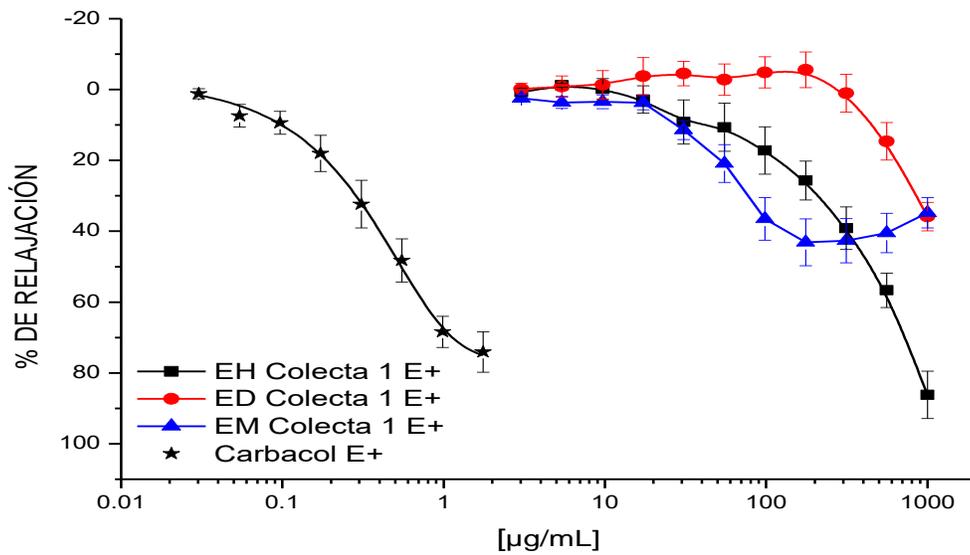
9.1 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA EN MODELO *EX VIVO*

9.1.1 Evaluación del efecto de los extractos orgánicos de *Eryngium heterophyllum* sobre anillos de aorta pre-contráidos con NA.

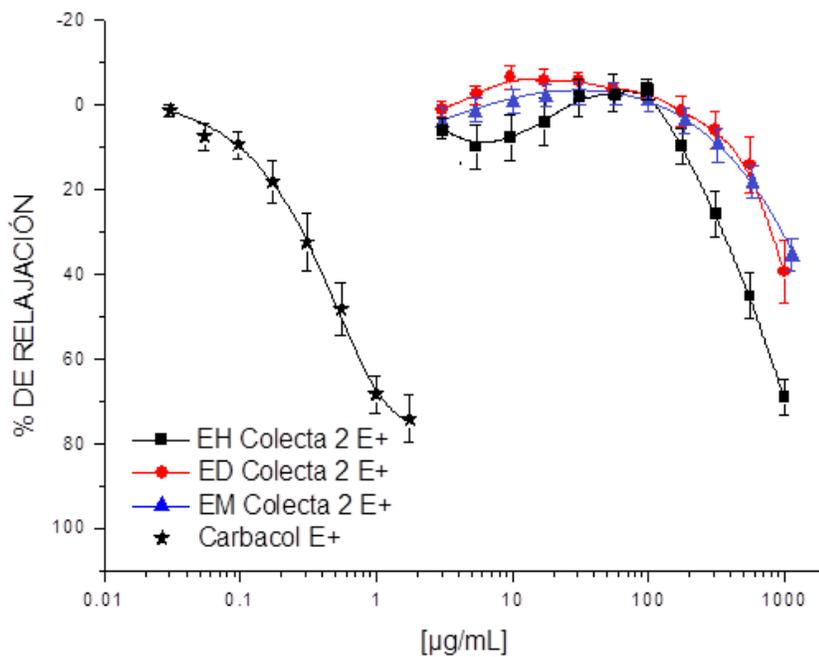
De acuerdo a los efectos descritos en la medicina tradicional sobre *E. heterophyllum* para el tratamiento de hipertensión, se realizaron estudios *ex vivo* para determinar el efecto vasorrelajante de *E. heterophyllum* utilizando anillos de aorta aislada de rata en presencia de endotelio vascular, a los cuales se les agregaron los extractos orgánicos (hexánico, diclorometánico y metanólico) de manera acumulativa a la cámara de tejido aislado. Para contraer el tejido utilizamos noradrenalina (N.A) [0.1 μ M], mientras que como control para estos ensayos utilizamos Carbacol [0.1 μ M]. En este sentido, en la gráfica 1 analizamos el efecto vasorrelajante dependiente de la concentración de la colecta 1, en la cual observamos un mayor efecto vasorrelajante del extracto hexánico de *E. heterophyllum* (EHeEh) (~ 86.21 % de relajación) con respecto a los extractos metanólico (EMeEh) y diclorometánico (EDiEh), mientras que en la gráfica 2 observamos el efecto vasorrelajante de la colecta 2, en donde determinamos que al igual que la colecta 1, el EHeEh (~ 69.06%) presentó un mayor efecto vasorrelajante en comparación con los demás extractos.

En las tablas 6 y 7 se presentan los valores de porcentaje de relajación y la CE_{50} de los extractos evaluados derivados de la colecta 1 y 2, respectivamente, en donde podemos observar que el EHeEh presenta una mayor eficacia y potencia en ambas colectas, mientras que el extracto metanólico y diclorometánico a pesar de observar un efecto vasorrelajante, no mostraron una relajación con significancia estadística.

Debido al efecto relajante mostrado por el EHeEh en la aorta aislada de rata, se decidió determinar el potencial relajante en presencia y ausencia de endotelio.



Gráfica 1. Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de *E. heterophyllum* (colecta 1) en anillos de aorta aislada de rata sobre la contracción inducida por Noradrenalina (NA) 0.1 µM



Gráfica 2. Efecto vasorrelajante de los extractos orgánicos de *E. heterophyllum* (colecta 2) en anillos de aorta aislada de rata sobre la contracción inducida por Noradrenalina (NA) 0.1 µM ANOVA de dos vías, post-hoc Bonferroni * $p < 0.001$.



Tabla 6. Porcentaje de relajación en aorta aislada de rata de la colecta 1.

Extracto	% de relajación en aorta	CE ₅₀ µg/mL
EHeEh (1)	86.21 ± 6.68 %	337.05 ± 6.00 µg/mL
EMeEh (1)	34.80 ± 4.27 %	-
EDiEh (1)	35.94 ± 4.00 %	-

Tabla 7. Porcentaje de relajación en aorta aislada de rata de la colecta 2.

Extracto	% de relajación en aorta	CE ₅₀ µg/mL
EHeEh (2)	69.06 ± 4.51 %	µg/mL
EMeEh (2)	37.27 ± 6.31	-
EDiEh (2)	39.33 ± 7.48	-

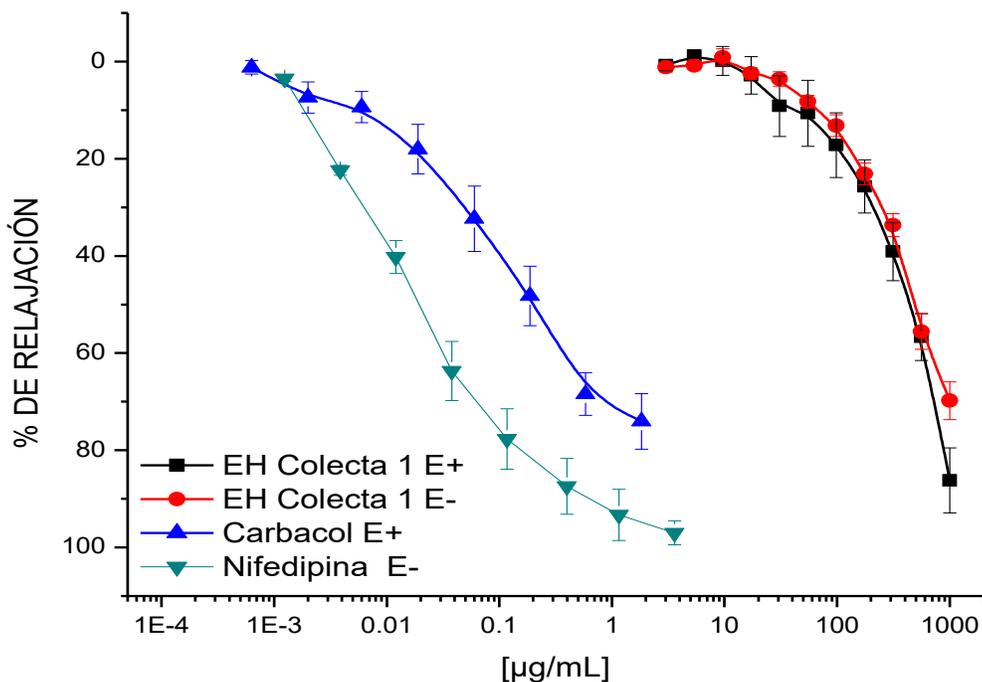
9.1.2 Determinación del efecto vasorrelajante del EHeEh

Con el fin de conocer si la respuesta vasorrelajante del extracto con mayor efecto producido es dependiente o independiente de endotelio, se construyeron curvas concentración-respuesta del EHeEh en presencia o ausencia de endotelio sobre anillos de aorta.

Como podemos observar en la gráfica 3, el porcentaje de relajación no muestra una diferencia estadísticamente significativa entre el efecto vasorrelajante en presencia de endotelio y en ausencia de endotelio (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de relajación en aorta aislada de rata del EHeEh en presencia y ausencia de endotelio

Extracto Hexánico	% de relajación en aorta	CE ₅₀ µg/mL
EheEh c/endotelio	86.21 ± 6.68 %	337.05 ± 6.00 µg/mL
EheEh s/endotelio	69.78 ± 3.88 %	329.11 ± 2.35 µg/mL



Grafica 3. Efecto vasorrelajante del EHeEh en presencia y en ausencia de endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos-hoc Bonferroni ($p < 0.001$)

Con base en los resultados obtenidos, podemos establecer que el efecto del EHeEh es independiente de la presencia de endotelio, dicho resultado nos permite tener también una idea acerca del mecanismo de acción del extracto, el cual podría estar relacionado con un bloqueo directo de receptores acoplados a proteína G (adrenérgicos, serotoninérgico, angiotensina) mediante el bloqueo de canales de calcio, o una posible interacción con el complejo de Ca^{2+} -CaM, entre otros [Vergara., 2008], los cuales solamente se encuentran en el músculo liso. En este sentido, y con lo anteriormente expuesto, seleccionamos el extracto hexánico (EHeEh) para determinar su mecanismo de acción.

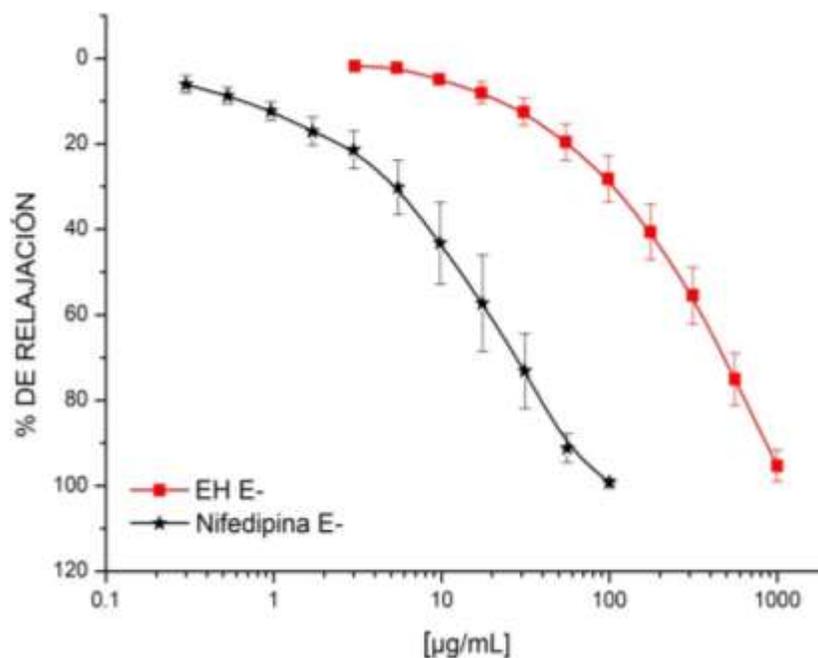


9.1.3 Determinación del mecanismo de acción funcional en aorta aislada de rata.

Para establecer el mecanismo de acción, se siguió la metodología descrita previamente. Por lo que se exploraron distintos mecanismos de acción funcional, los cuales podrían verse relacionados en el proceso de relajación-contracción de la musculatura lisa independiente de endotelio.

9.1.3.1 Participación de canales de calcio en la contracción inducidas por KCl

Con el propósito de determinar si el efecto relajante que muestra el tejido está siendo inducido por un posible bloqueo de canales de calcio, se realizaron curvas de concentración-respuesta de manera acumulativa del EHeEh a la contracción inducida por KCl [80 mM]. Con el objetivo de demostrar si el EHeEh tiene influencia en la despolarización de la membrana y la movilización de Ca^{2+} extracelular, y de esta forma promover un efecto vasorrelajante, se llevó a cabo una curva concentración-respuesta de relajación a la contracción inducida por KCl [80 mM] mostrada en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Efecto del EHeEh en la contracción inducida por KCl en anillos de aorta aislada de rata. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni * $p < 0.001$



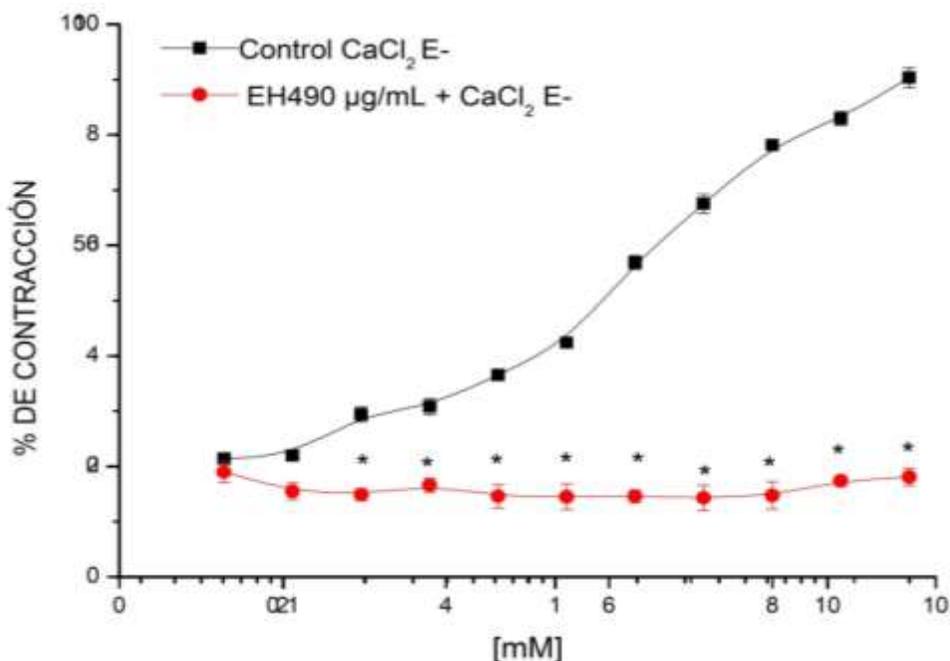
En la gráfica 4 se observa que el EHeEh es capaz de relajar la contracción inducida por KCl de manera dependiente de la concentración. Con base en esto, podemos inferir que el mecanismo de acción funcional del EHeEh podría estar directamente relacionado con el bloqueo del ingreso de Ca^{2+} extracelular, impidiendo la contracción en las células del músculo liso.

Una vez que obtuvimos una actividad estadísticamente significativa en la relajación del tejido, procedimos a realizar un segundo experimento con el propósito de confirmar el potencial bloqueo de canales de calcio, para lo cual se indujo una contracción en presencia de CaCl_2 .

9.1.3.2 Participación de los canales de Calcio en la contracción inducida por CaCl_2

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento previo, se decidió confirmar el efecto del EHeEh en una curva de concentración-respuesta de la contracción inducida por CaCl_2 , lo que permitió confirmar que el mecanismo de acción está directamente relacionado con el bloqueo de los canales de Ca^{2+} .

En la gráfica 5, observamos una oposición completa a la contracción inducida por CaCl_2 cuando los tejidos fueron preincubados con el EHeEh con respecto a la curva control de CaCl_2 . Estos resultados sugieren claramente que existe un efecto relajante de la musculatura lisa vascular, la cual esta mediada por el bloqueo de canales de calcio tipo L responsables del proceso de contracción en este tipo de tejidos. Cabe destacar la importancia de los canales de calcio en el proceso anormal que se presenta en la hipertensión (Touyz et al ., 2018), por lo que la efectividad de los bloqueadores de canales de calcio tipo L para el tratamiento de este padecimiento es de suma importancia para llevar a cabo otros estudios farmacodinámicos en modelos murinos *in vivo*, por lo que decidimos realizar un ensayo antihipertensivo agudo con el extracto hexánico, que resultó ser el extracto más activo en los estudios funcionales.



Gráfica 5. Efecto de la CE₅₀ [490 µg/ml] del EHeEh en la contracción inducida por CaCl₂ en anillos de aorta aislada de rata sin endotelio. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni *p < 0.001

Con base en los resultados mostrados anteriormente, se pudo establecer el efecto vasorrelajante que se le atribuye a *E. heterophyllum*, de los cuales hasta la fecha no se han reportado estudios previos relacionados a esta actividad, con lo que podría presentarse como una fuente potencial de moléculas vasorrelajante.

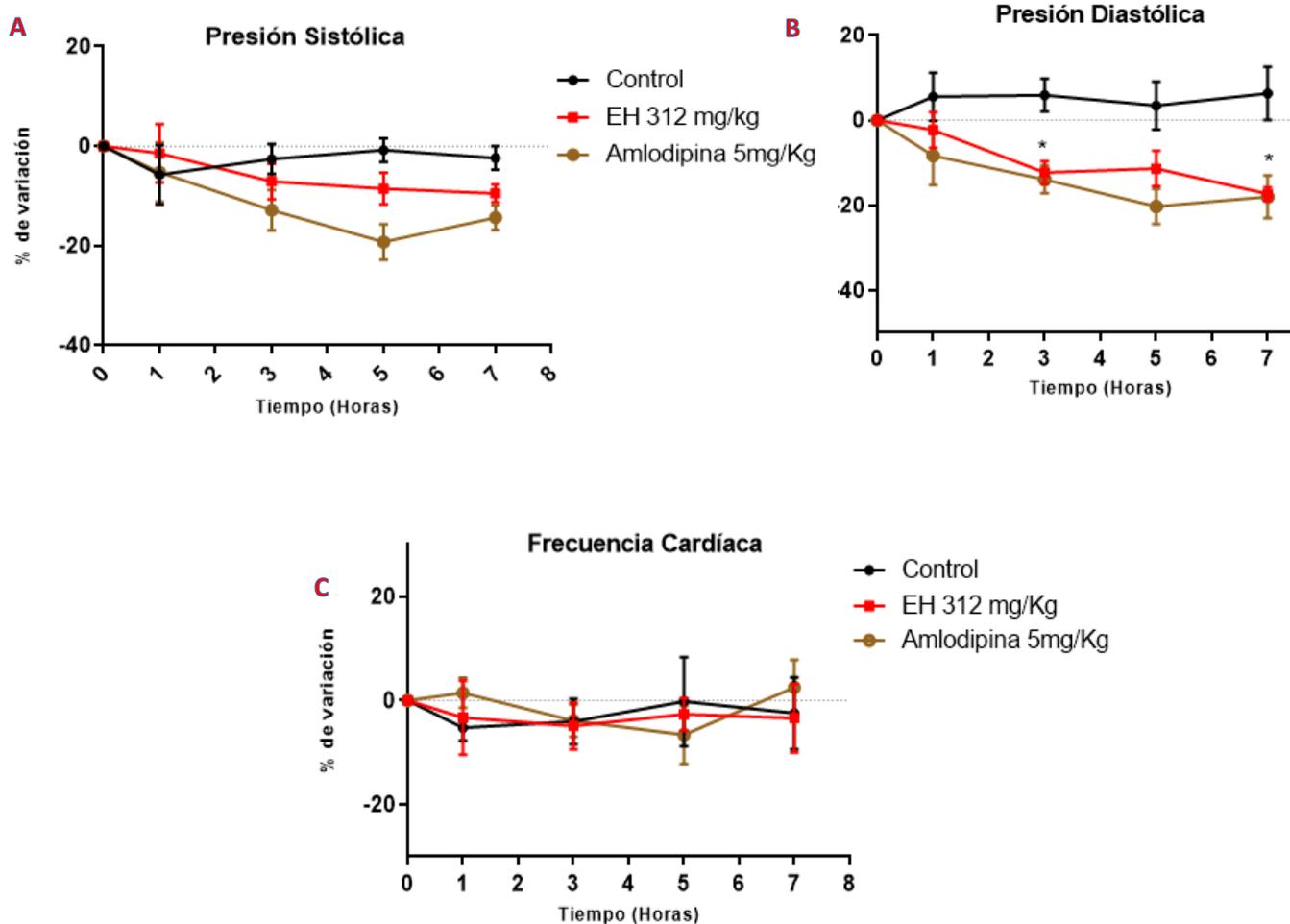
9.2 Efecto del ensayo antihipertensivo agudo de EHeEh en ratas SHR.

Durante el ensayo agudo antihipertensivo, la presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y frecuencia cardiaca (FC) de los animales fueron monitoreadas durante las 7 horas posterior a la administración vía oral a una sola dosis para observar la eficacia de un tratamiento agudo con el EHeEh.

En la gráfica 6 observamos el porcentaje de variación respecto al tiempo de la presión arterial sistólica (A), diastólica (B) y frecuencia cardiaca (C) de los animales administrados a una dosis de 312 mg/kg del EHeEh. Una observación



importante fue que la presión diastólica disminuye con respecto al grupo control y sus valores antes de la administración, además de que nos permite determinar que el efecto anti hipertensivo es sostenido y estadísticamente significativo a la hora 3 y a la hora 7 (* $p > 0.05$), mientras que a pesar de que en la presión sistólica (B) y la frecuencia cardíaca (C) hubo una disminución, este efecto no fue sostenido y tampoco mostraron una diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Cabe destacar que los resultados obtenidos en el ensayo antihipertensivo son consistentes con los resultados *in vitro* expuestos previamente.



Gráfica 6. Ensayo antihipertensivo agudo. Porcentaje de variación de la presión sistólica(A), diastólica (B) y frecuencia cardíaca(C) de ratas SHR con una dosis de 312mg/kg del EHeEh, grupo control (Tween 80 al 10%) y Amlodipina 5mg/Kg. ANOVA de dos vías post-hoc Bonferroni * $p < 0.01$



La disminución de la presión arterial es una característica de los bloqueadores de canales de calcio. Actúan impidiendo que el calcio ingrese a las células del corazón y las arterias, generando una acción hipotensora debida fundamentalmente a la relajación arteriolar sistémica con vasodilatación que estas moléculas producen. Los canales de calcio son proteínas de membrana que constituyen la vía más importante para el ingreso del ion calcio (Ca^{2+}) a la célula. Al abrirse, permiten el ingreso selectivo del ion, iniciando una variedad de procesos como contracción muscular, secreción endocrina y liberación de neurotransmisores, entre otros (Lozano Jiménez & Sánchez Mora, 2020).

Adicionalmente, estudios realizados por Navarrete; 1990 y colaboradores, llevaron a cabo un estudio sobre *E. heterophyllum* en el que trataron con extractos acuosos o metanólico en mujeres de edades comprendidas entre 30 y 35 años, obteniendo efectos significativos como hipotensor (Navarrete.,1990 &Palá.,2002).

9.3 Efecto antihiper glucémico en ratas Wistar normoglucémicas

Adicionalmente, y de acuerdo a otro de los efectos reportados de *E. heterophyllum* en la medicina tradicional, se realizaron ensayos *in vivo* para determinar el efecto antihiper glucémico, en el cual se utilizaron ratas macho normoglucémicas de la cepa Wistar, en presencia de los extractos orgánicos (hexánico, metanólico y diclorometánico) de *Eryngium heterophyllum* a una dosis única experimental (100 mg/kg) a través de una curva de tolerancia a la glucosa (CTG), la cual es una prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa (carga de 2 g/kg), a lo largo del tiempo (2h), y es útil para analizar la capacidad del organismo para mantener los niveles de glucemia en homeóstasis posterior a la administración vía oral de una carga de glucosa. De manera que en los sujetos con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y en el caso particular de los sujetos con (DT2), esta capacidad se encuentra disminuida (Trujillo Arriaga, 2007).



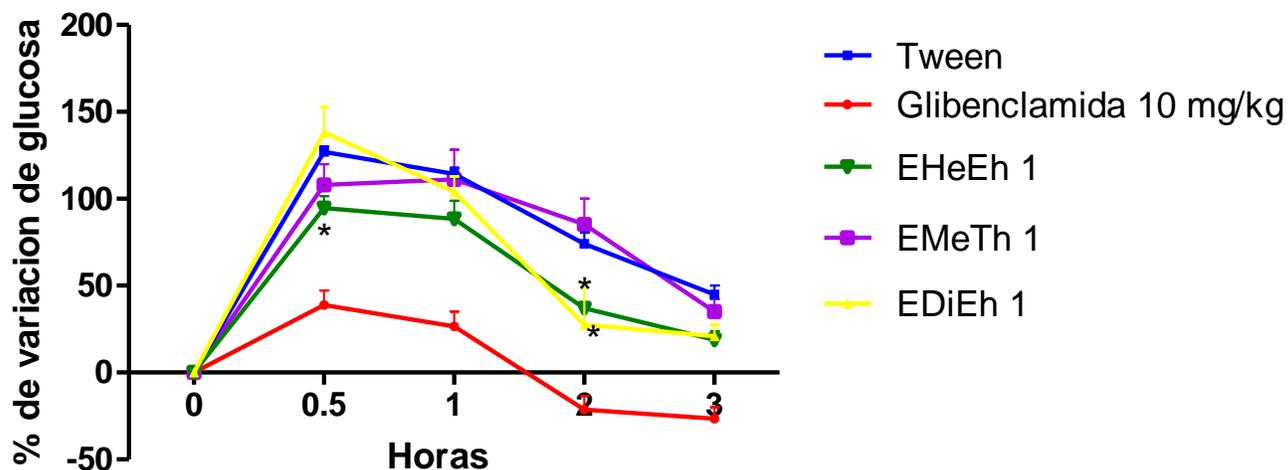
Los agentes hipoglucemiantes pueden ejercer sus efectos a través de tres mecanismos principales: 1) Disminuyendo la absorción intestinal de glucosa, 2) Estimulando la secreción de insulina por parte de las células beta pancreática y favoreciendo la incorporación de glucosa en los tejidos blancos de la insulina como el músculo, el hígado o el tejido adiposo. 3) Disminución de la concentración de glucosa en la sangre promoviendo la acción del metabolismo y uso de los azúcares por los tejidos (Zapata-Bustos et al., 2009). De tal manera que las CTG logran describir el potencial antihiper glucémico de las muestras prueba y nos dan un indicio del nivel al cual actúa el extracto a prueba.

El efecto hipoglucemiante de los extractos orgánicos obtenidos de la planta *E. heterophyllum* de la colecta 1 (Chiapas) se muestran en la gráfica 7, en donde podemos observar que de los tres extractos evaluados, el extracto hexánico (EHeEh) comienza a disminuir el pico hiper glucémico de manera considerable con una diferencia significativa respecto al vehículo a la hora 0.5 y a la hora 2, mientras que el extracto Diclorometánico (EDiEh) solo presenta una disminución a la hora 2. El extracto Metanólico (EMeEh) no presenta ningún efecto antihiper glucémico en las horas evaluadas.

Dado los resultados obtenidos se decidió realizar una segunda curva de tolerancia a la glucosa de la colecta 2 (Morelos) para evaluar el efecto de los extractos orgánicos obtenidos de esta. En la gráfica 8 que muestra el efecto de dichos extractos, en el cual podemos observar que el porcentaje de variación de la glucosa respecto al tiempo tuvo una mayor disminución en los animales administrados con el extracto hexánico, el cual presenta una diferencia significativa respecto al control a la hora 0,5, 1 y 3 post administración oral del EHeEh.

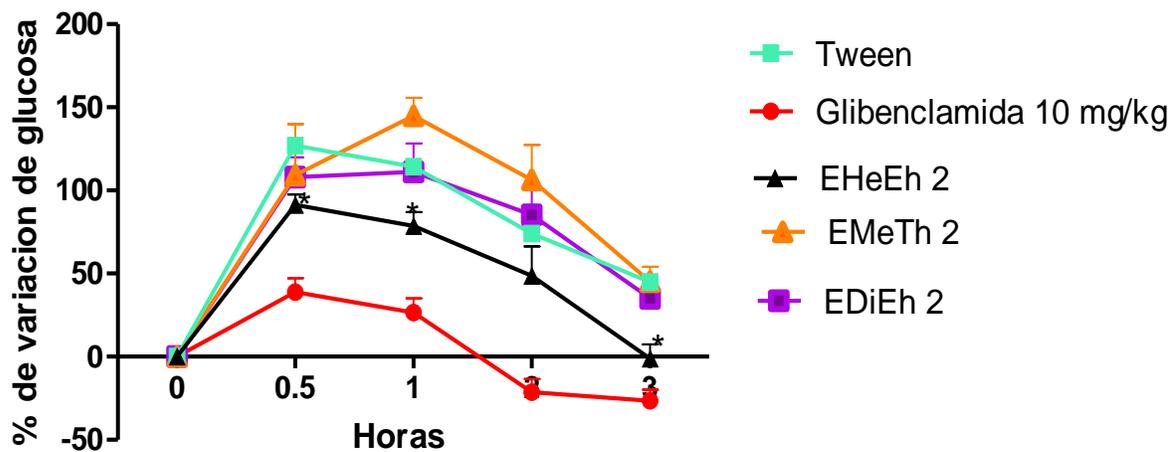


CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA



Gráfica 7. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar normoglucémicas de los extractos orgánicos obtenidos de *Eryngium heterophyllum* (100mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%) y glibenclamida (10mg/kg) de la colecta 1 (Edo. Chiapas). ($p<0.05$)

CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA

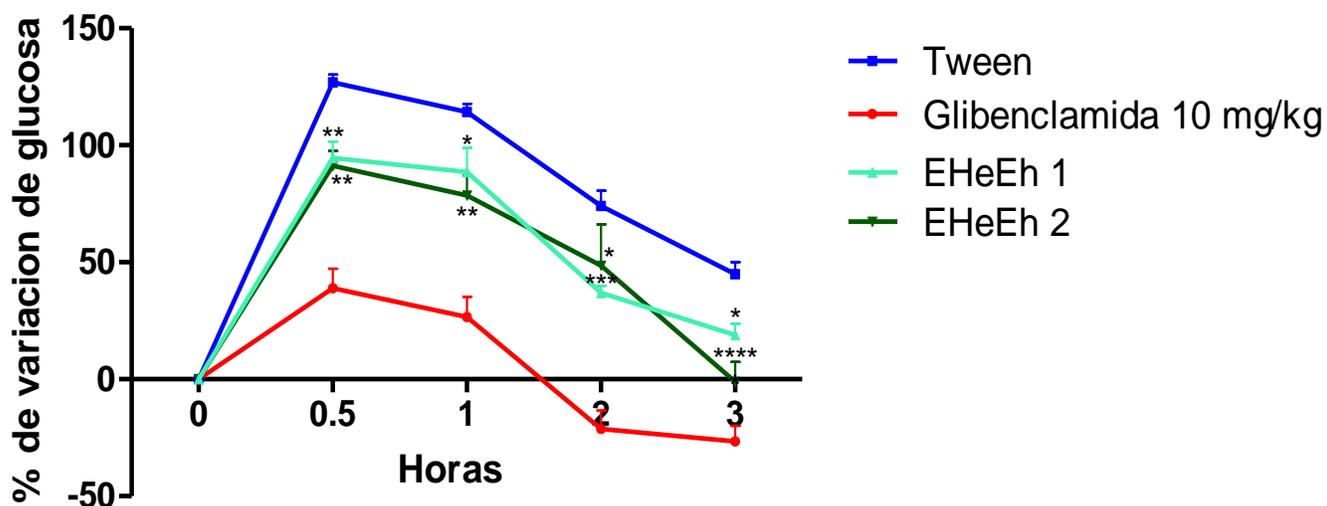


Gráfica 8. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar normoglucémicas de los extractos orgánicos obtenidos de *Eryngium heterophyllum* (100mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%) y glibenclamida (10mg/kg) de la colecta 2 ($p<0.05$)



Con el fin de seleccionar el extracto más eficaz para experimentos posteriores, comparamos los extractos con mayor efecto obtenidos de la colecta 1 y colecta 2, los cuales se muestran en la gráfica 9, de la que se puede notar que el EHeEh de la colecta 2 tuvo considerablemente un efecto sostenido y estadísticamente significativo a las 0.5, 1, 2, 3 horas con una “p” significativa respecto al grupo control en cada una de las horas a las cuales fueron evaluados, siendo el extracto más activo. Dichos resultados nos muestran el potencial del extracto, demostrando la capacidad de restaurar a niveles basales las concentraciones plasmáticas de glucosa presente en la sangre durante las horas de ensayo a través de mecanismos de acción que podrían favorecer la sensibilidad a la insulina, , sin embargo, pese a los datos reportados anteriormente en otros estudios, no se ha descrito ningún mecanismo de acción antidiabético.

CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA



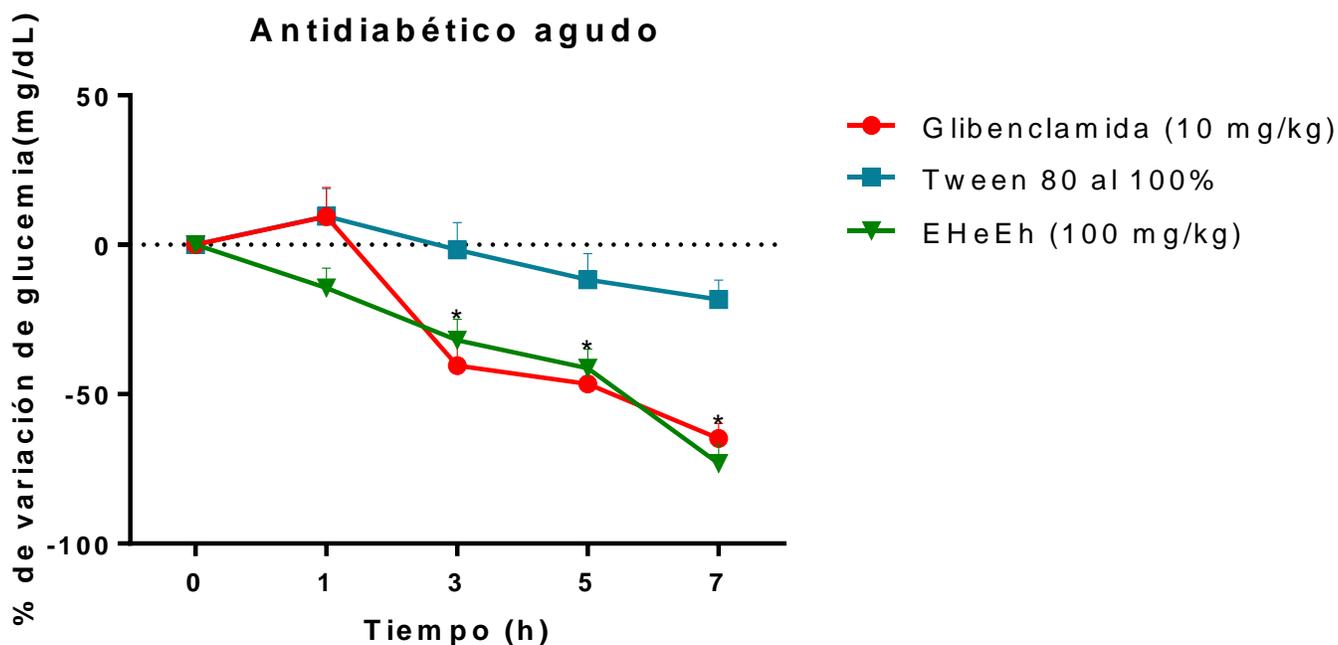
Gráfica 9. Curva de tolerancia a la glucosa. Comparación del EHeEh1 y EHeEh 2. Vehículo (tween 80 al 10%) y glibenclamida (10 mg/kg) (* p< 0.05)



9.4 Efecto antidiabético agudo en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente en rata.

Con base a los resultados obtenidos previamente de las CTG, se decidió llevar a cabo ensayos antidiabéticos agudos del EHeEh con mayor efecto. En este estudio se evaluó la capacidad de dicho extracto para producir un efecto antidiabético en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente agudo simulando un paciente con DT-2, el cual nos permite determinar la variación de glucemia plasmática de manera temporal (7hrs) en una sola dosis (100 mg/Kg).

En la gráfica 10 observamos los resultados de la disminución de glucemia inducida por la administración del EHeEh en los animales diabéticos, tal como se encontró también en las curvas de tolerancia a la glucosa realizadas previamente. Como se observa, el efecto mostró una disminución significativa de los niveles de glucosa, presentando un efecto antidiabético significativo sostenido a partir de la hora 3 post-administración ($p < 0.05$) comparado con el vehículo utilizado (tween 80 a 10%), el cual se mantiene hasta la hora 7 de manera muy similar al grupo administrado con glibenclamida (secretagogo de insulina).



Gráfica 10. Ensayo del efecto antidiabético agudo del EHeEh (100 mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%) y glibenclamida (10 mg/kg) en un modelo de rata no insulino dependiente. (* $p < 0.05$)



Debido a la forma y tiempo de los resultados obtenidos, observamos que podría presentarse un mecanismo de insulino-sensibilizador, característico de los actuales fármacos insulino-sensibilizadores, los cuales comienzan a disminuir de forma significativa en las primeras horas de administración debido a que el efecto de estos fármacos depende de la activación de receptores nucleares y la posterior sensibilización de la insulina (Lahsen M & Liberman G, 2003)

Los insulino-sensibilizadores son fármacos que potencian el efecto de la insulina o disminuyen la resistencia a ella, reducen la hiperglicemia y la hiperinsulinemia, con lo que la célula beta queda en reposo y alivia la inexorable fatiga que ocurre con la disfunción de las células beta (Rolla, 2003).

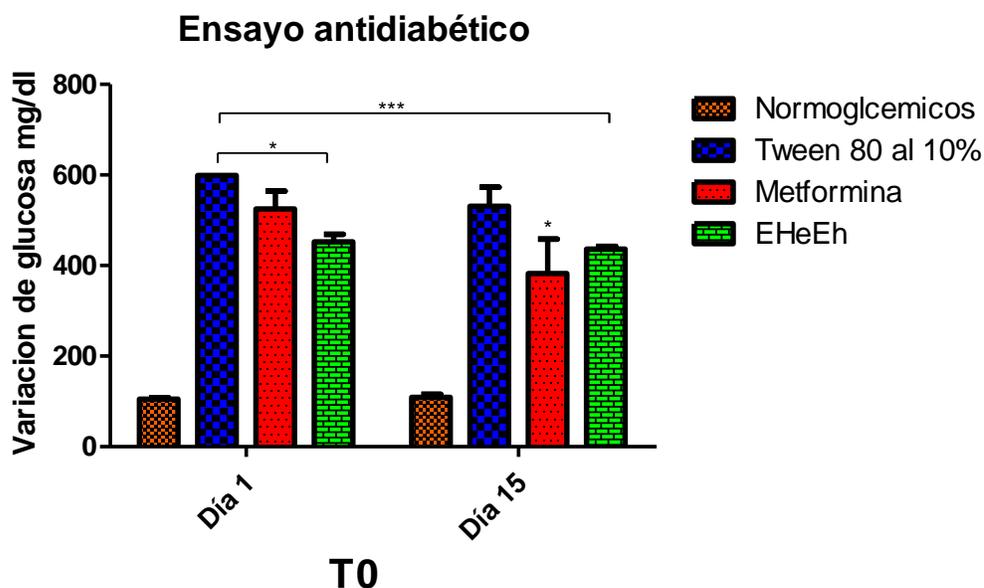
9.5 Efecto antidiabético sub-agudo en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente en rata.

El tratamiento actual para enfermedades crónico degenerativo como lo es la DT-2 requiere la administración diaria de fármacos por tiempos prolongados con el fin de prevenir las complicaciones a largo plazo, por lo que para tener una visión más detallada del potencial antidiabético del EHeEh se plantea el uso de modelos subagudos, este modelo animal asemeja una disminución en la secreción insulina, dado que es el principal factor de estados hiperglucémicos en personas con diabetes, presentando así, elevados niveles de glucemia plasmática, por lo cual una vez demostrado el efecto agudo del EHeEh, se procedió a determinar el efecto subagudo, el cual consiste en la administración durante un periodo de 15 días, con la finalidad de determinar los efectos acumulativos de la administración diaria del extracto, este experimento que se realiza sin la inducción de ayuno es útil para evaluar si el extracto es capaz de mantener de manera constante los niveles normales de glucosa en un animal enfermo, de igual manera nos permite la obtención del perfil bioquímico y técnicas de biología molecular para establecer si existen cambios permanentes en el metabolismo de los animales tratados y sin tratar.



El seguimiento de los niveles de glucosa del modelo antidiabético en ratas se realizó durante 15 días de tratamiento con el extracto EHeEh (tratamiento), Metformina (control positivo), Tween 80 al 10% (vehículo) y ratas normoglucémicas (control negativo), de los cuales se llevó a cabo mediante la toma de glucosa (G0) antes de la administración del extracto (Gráfica 11), lo cual nos ayuda a analizar si el tratamiento induce una disminución en el porcentaje de variación de la glucosa 24 horas post administración. Consecuentemente, se realizó un segundo seguimiento a la hora 5 (G5) posterior a la administración diaria (Gráfica 12) lo que nos permiten tener una idea acerca del efecto producido por el extracto a través de la acumulación de este mismo durante el tiempo del tratamiento (15 días).

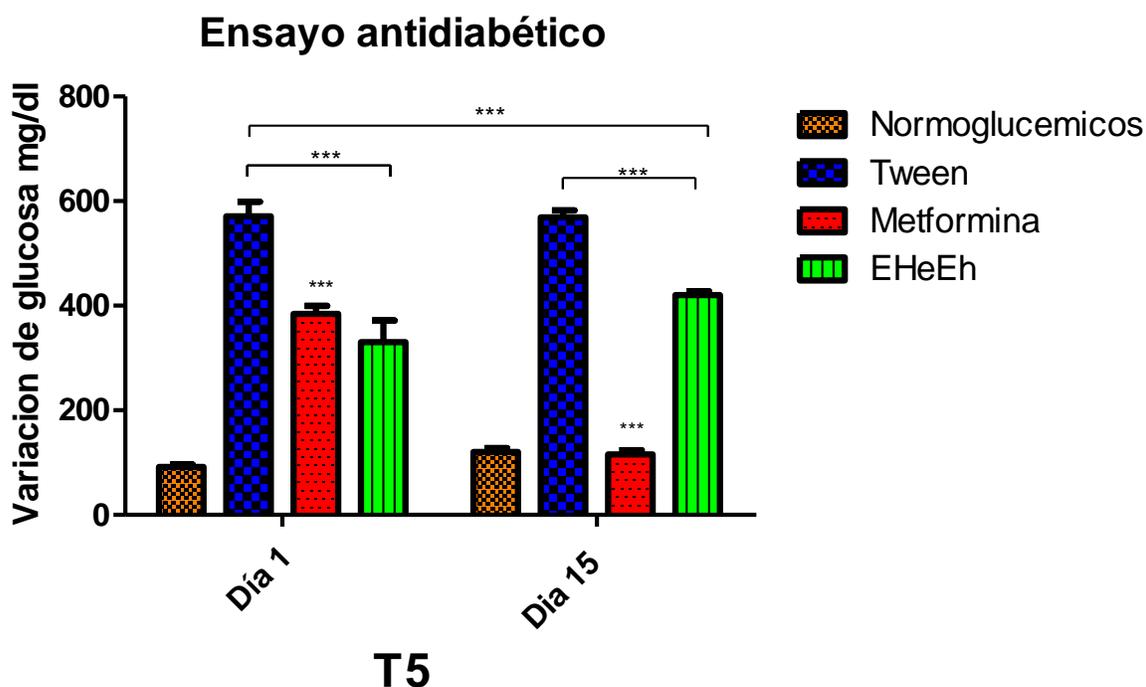
La Gráfica 11 muestra la variación de glucosa del T0 previo a la administración del día 1 en comparación del T0 con el último día de tratamiento, como podemos observar se muestra una disminución estadísticamente significativa del grupo tratado con metformina el día 15, mientras que el EHeEh comienza a presentar una disminución estadísticamente significativa desde el primer día comparado con el grupo administrado con el vehículo (Tween 80 al 10%)



Gráfica 11. Glucemia previa a administración (T0) oral subaguda del EHeEh (100mg/Kg), Vehículo (tween 80 al 10%), Metformina (120 mg/Kg), en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente de ratas, durante 15 días. Cada grupo representa el promedio de \pm EE, n=6; ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni *p < 0.05



Por otro lado, en la Gráfica 12, se muestra la variación de la glucosa en el tiempo T5, comparando la administración diaria a partir del día 1 contra el último día de tratamiento (día 15), donde podemos observar la disminución estadísticamente significativa tanto del grupo tratado con metformina como del grupo tratado con el extracto, comparado con el grupo vehículo del primer día de tratamiento y del día 15 de tratamiento, cabe destacar de que a pesar de no observar una disminución tan acelerada como la del grupo metformina, la disminución de la variación de glucosa permanece constante y con niveles significativos por debajo del grupo vehículo. También es muy probable que al aumentar los días de tratamiento pudiéramos observar una mayor disminución de glucemia en los animales tratados.

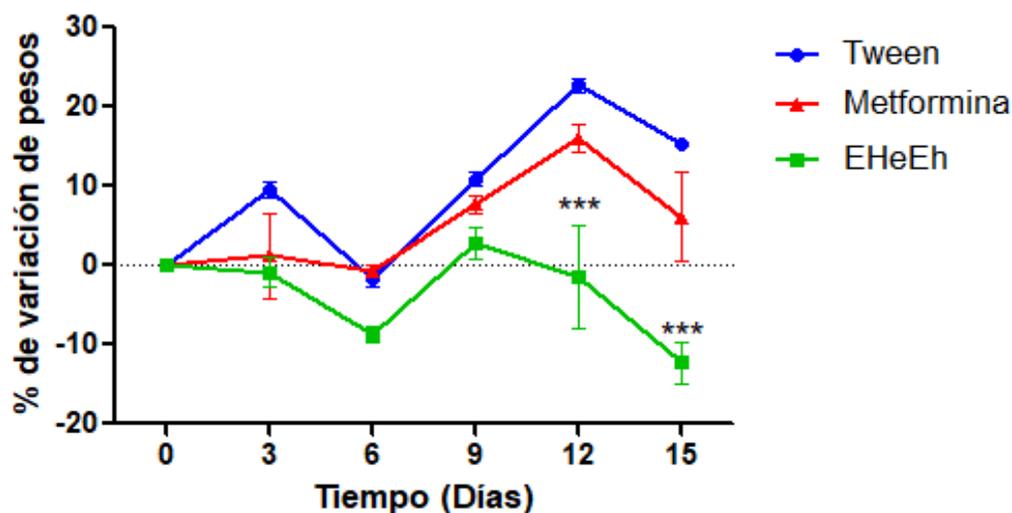


Gráfica 12. Glucemia post-administración (T5) oral subaguda del EHeEh (100mg/Kg), Vehículo (tween 80 al 10%), Metformina (120 mg/Kg), en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente de ratas, durante 15 días. Cada grupo representa el promedio de \pm EE, n=6; ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni *p < 0.05



En el transcurso y al termino del ensayo antidiabético subagudo se pesaron los diferentes grupos de animales empleados para comparar si existía una variación (disminución o aumento) en el peso total de los animales, con base esto, podemos observar dichos resultados en la Gráfica 13 donde se muestra el monitoreo de los pesos en el día previo al ensayo, 3, 6, 9, 12 y 15 del proceso experimental en donde observamos una disminución en el porcentaje de variación de peso del grupo tratado con el extracto a partir del día 12, el cual es estadísticamente significativo.

Estos resultados son consistentes con estudios hechos previamente de plantas del mismo género *Eryngium* que han mostrado una disminución de niveles lipídicos y reducción de peso Pérez; 2016). (Pérez-Ramírez; 2015). (Anaya; 2016) (Montes-Moreno; 2017)



Gráfica 13. Porcentaje de variación de peso tras la administración oral con el EHeEh (100mg/Kg), vehículo (tween 80 al 10%) y meformina (120mg/kg) durante 15 días de tratamiento. ANOVA de dos vías seguida de una prueba pos hoc Bonferroni * $p < 0.05$

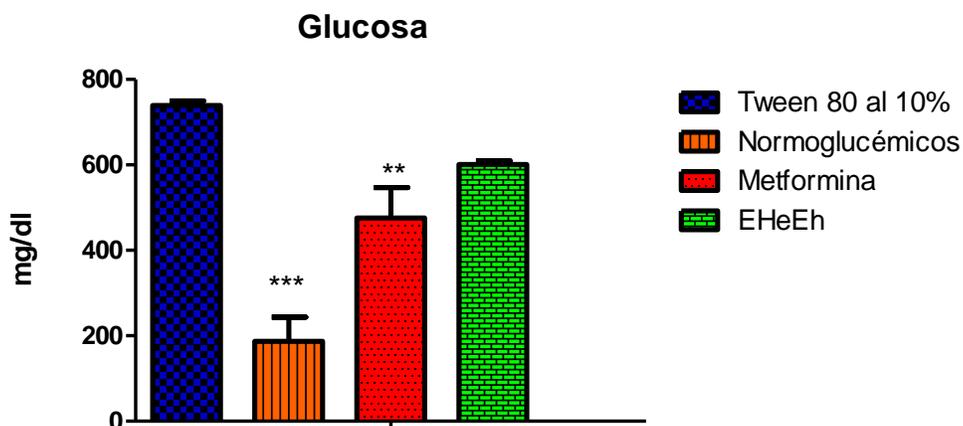
Actualmente se sabe que fármacos como metformina son utilizados por pacientes diabéticos asociados a la obesidad, los cuales presentan una disminución del peso, esto se debe a un incremento en la sensibilidad periférica a la insulina provocada por la poca producción hepática de glucosa, reduciendo la absorción intestinal de la misma, lo que modifica el peso corporal por un efecto anorexigénico.



9.5.1 Análisis de perfil de glucosa y lípidos

Una vez terminado el ensayo antidiabético sub-agudo se procedió a la determinación del perfil bioquímico, el cual consiste en un grupo de exámenes de sangre que indican la forma como el cuerpo utiliza, cambia y almacena los lípidos, sin embargo, al ser insolubles tienden a pegarse a las proteínas, por lo que reciben el nombre de lipoproteínas. La cantidad de estos puede cambiar debido a diversos factores, como dieta, genética, o alguna enfermedad como es el caso de pacientes diabéticos. Por lo que con el fin de establecer el efecto ejercido sobre la disminución de la glucosa y lípidos del extracto hexánico de *Eryngium heterophyllum*, se midieron los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de los grupos empleados en el estudio subagudo, el cual se realizó en colaboración de la Bióloga Irene del Centro Médico UAEM.

En la gráfica 14 determinamos que tras el tratamiento de 15 días, no se observan cambios estadísticamente significativos en la disminución de glucosa, sin embargo, si podemos observar una disminución aparente de glucosa del grupo tratado con EHeEh respecto al vehículo, en donde observamos una tendencia a disminuir, lo cual nos podría indicar que al aumentar el número de días de tratamiento pudiera generar resultados significativos, sin embargo, dado los resultados obtenidos, no podemos atribuirle al EHeEh un efecto antidiabético y se requieren ensayos con un tiempo de tratamiento más prolongado para poder observar un efecto significativo.

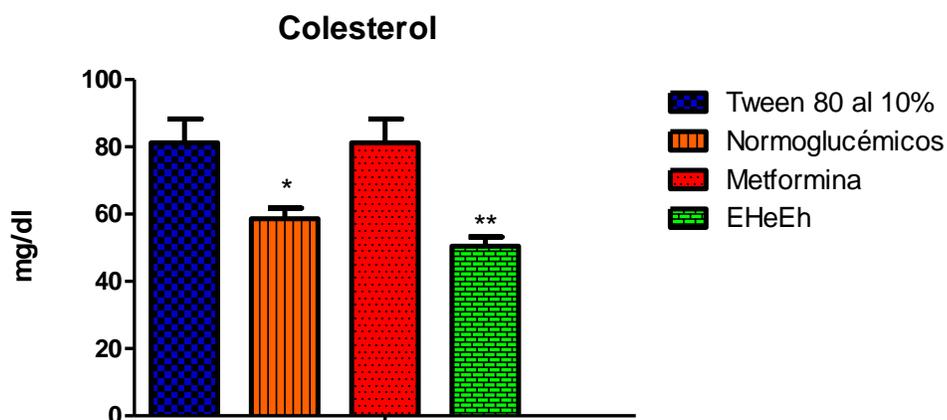


Gráfica 14. Perfil de glucosa tras la administración oral subaguda del EHeEh (100 mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%), y meformina (120mg/kg) durante 15 días de tratamiento, en un modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente. Cada grupo representa el promedio \pm EEM; n=7. ANOVA de dos vías *p < 0.05 vs vehículo.



Los pacientes con diabetes tipo 2 sufren alteraciones metabólicas no solamente relacionadas con el incremento y regulación de los niveles plasmáticos de glucosa, sino también desregulación del metabolismo de lípidos, lo cual se ve reflejado en un incremento significativo de los niveles plasmáticos de colesterol, lipoproteína de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG), además de una disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Además de analizar el perfil de glucosa, por otro lado también determinamos los perfiles de lípidos, en la Gráfica 15 observamos el nivel basal de colesterol total comparado con el grupo vehículo, en donde podemos observar una clara disminución estadísticamente significativa del grupo tratado con el extracto hexánico de *E. heterophyllum*, incluso por debajo del grupo normoglucémico y el grupo tratado con metformina, logrando disminuir a niveles normales de colesterol total establecidos para animales de experimentación entre 43.6 - 54 mg/dl (Mendoza-Ventura., 2017)



Gráfica 15. Perfil de colesterol total tras la administración oral subaguda del EHeEh (100 mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%), y meformina (120mg/kg) durante 15 días de tratamiento, en un modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente. Cada grupo representa el promedio \pm EEM; n=7. ANOVA de dos vías *p < 0.05 vs vehículo.

Los resultados obtenidos son además consistentes con estudios realizados previamente en la década de los noventa por el Dr. Navarrete (1990) y su grupo de trabajo, los cuales mostraron efectos hipocolesterémicos significativos en ratas, reduciendo el nivel de colesterol en un 20-27%. Además, realizaron estudios sobre

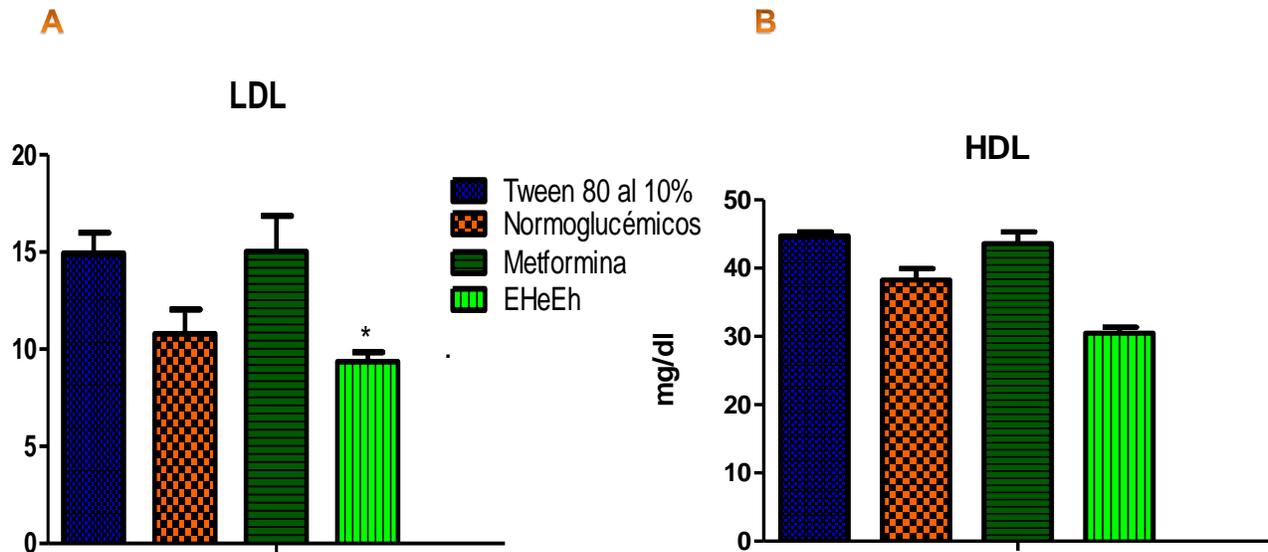


la química de la planta, logrando aislar manitol, glucosa y β -sitosterol, a los cuales se les atribuyo el efecto hipocolesterémicos ejercido (Palá; 2002).

El colesterol es un lípido insoluble en agua, presente en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo, sin embargo, la acumulación excesiva de colesterol en los tejidos y concentraciones elevadas de colesterol en la sangre (hipercolesterolemia) tienen consecuencias perjudiciales para la salud, el colesterol sérico por encima de los niveles recomendados aumenta la probabilidad de desarrollar alguna enfermedad cardiovascular o arterosclerosis; Esto es particularmente cierto para las células endoteliales que forman la pared arterial, donde la acumulación de colesterol inicia la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Saavedra-Bolaina; 2012).

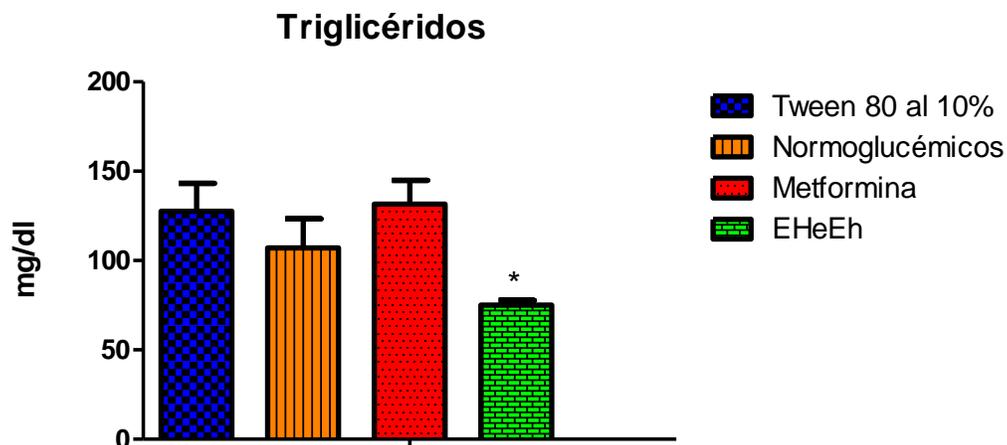
Cerca del 70% del colesterol se encuentra unido a lipoproteínas plasmáticas en forma de ésteres de colesterol, las lipoproteínas cuentan con distintas densidades, esto se debe a la proporción relativa de lípidos y proteínas que posee cada partícula, y solo se encuentra presente en forma de complejos macromoleculares denominados lipoproteínas, las cuales se dividen en LDL (lipoproteína de alta densidad), VLDL (lipoproteínas muy baja densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad) estas últimas denominadas a menudo como “colesterol malo”)

Por lo cual, se evaluaron los niveles de LDL (Gráfica 16A) y HDL (Gráfica 16B). Como podemos observar, los niveles de LDL se modifican respecto al grupo control, presentando una disminución estadísticamente significativa hasta valores normales entre 2.8-18.6 mg/dl, mientras que para HDL los valores obtenidos no se modifican significativamente, ni presentan significancia estadística, sin embargo, se establecen de acuerdo a los valores establecidos para animales de experimentación, donde los estándares de HDL (24.46 – 31.42 mg/dl) se consideran normales e ideales (Mendoza-Ventura., 2017).



Gráfica 16. HDL y LDL tras la administración oral subaguda del EHeEh (100 mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%), y meformina (120mg/kg) durante 15 días de tratamiento, en un modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente. Cada grupo representa el promedio \pm EEM; n=7. ANOVA de dos vías *p < 0.05 vs vehículo.

Por otro lado, en la gráfica 17, se observa la determinación del nivel basal de triglicéridos, donde de igual forma observamos la disminución de los niveles de triglicéridos comparado con el grupo vehículo, el cual es estadísticamente significativo.



Gráfica 17. Nivel basal de triglicéridos tras la administración oral subaguda del EHeEh (100 mg/kg), vehículo (tween 80 al 10%), y meformina (120mg/kg) durante 15 días de tratamiento, en un modelo experimental de diabetes no insulino-dependiente. Cada grupo representa el promedio \pm EEM; n=7. ANOVA de dos vías *p < 0.05 vs vehículo.



La determinación del perfil bioquímico junto con otros signos y síntomas, es útil para evaluar el riesgo de una dislipidemia (como la diabetes e hipertensión arterial) y sus complicaciones, cuyo elemento en común es una alteración del metabolismo de los lípidos, incluyendo la sobreproducción o deficiencia.

9.6 Evaluación toxicológica aguda

El ensayo se fundamentó según el método de las clases tóxicas descrito en la guía de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) número 423 (OCDE, 2002), en el cual se evaluaron diferentes dosis del extracto con el propósito de determinar el potencial toxicológico de EHeEh, dicho ensayo tiene el objetivo de predecir o determinar los posibles efectos que puede presentar en los humanos tras la exposición de forma aguda, es decir, los cambios, efectos adversos o incluso la muerte, que pueden ocurrir de inmediato o en corto tiempo tras la administración en un periodo no mayor a 24 horas.

Los resultados obtenidos durante el ensayo de toxicidad aguda oral con las dosis de 5, 50, 500 y 2000 mg/kg se muestran en la tabla 9, en la cual podemos observar que no se presentaron síntomas o signos aparentemente tóxicos, ni muerte durante el tiempo de experimentación, constantemente se observó una conducta normal en los animales administrados con EHeEh. Esto concuerda con el estudio realizado por (Carreón-Sánchez 2013) del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* en el cual evalúan el efecto tóxico en el modelo de intoxicación aguda. Con base a los resultados obtenidos podemos inferir que el EHeEh podría tener una DL_{50} mayor a 2000 mg/kg, y de acuerdo al Sistema Mundialmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA) (SGA 2011) nos permite asignar al extracto en la categoría 4 con leyenda de “nocivo en caso de ingestión” (Tabla 9 y 10).



Tabla 9. Resultados de ensayo de toxicológico agudo en ratones de la cepa CD1.

DOSIS (mg/kg)	MORTALIDAD	CLASIFICACIÓN SGA (toxicidad oral aguda)
5	0	4
50	0	
500	0	
2000	0	

Tabla 10. Asignación de los elementos de etiquetado de acuerdo a Sistema Mundialmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA).

TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL (INGESTIÓN)				
Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5
				<i>Sin pictograma</i>
Peligro	Peligro	Peligro	Atención	Atención
Mortal en caso de ingestión	Mortal en caso de ingestión	Tóxico en caso de ingestión	Nocivo en caso de ingestión	Puede ser nocivo en caso de ingestión

En el SGA se indican por este orden, el pictograma, la palabra de advertencia y la indicación de peligro para cada categoría de la clase de peligro correspondiente.

9.7 Evaluación toxicológica subcrónica

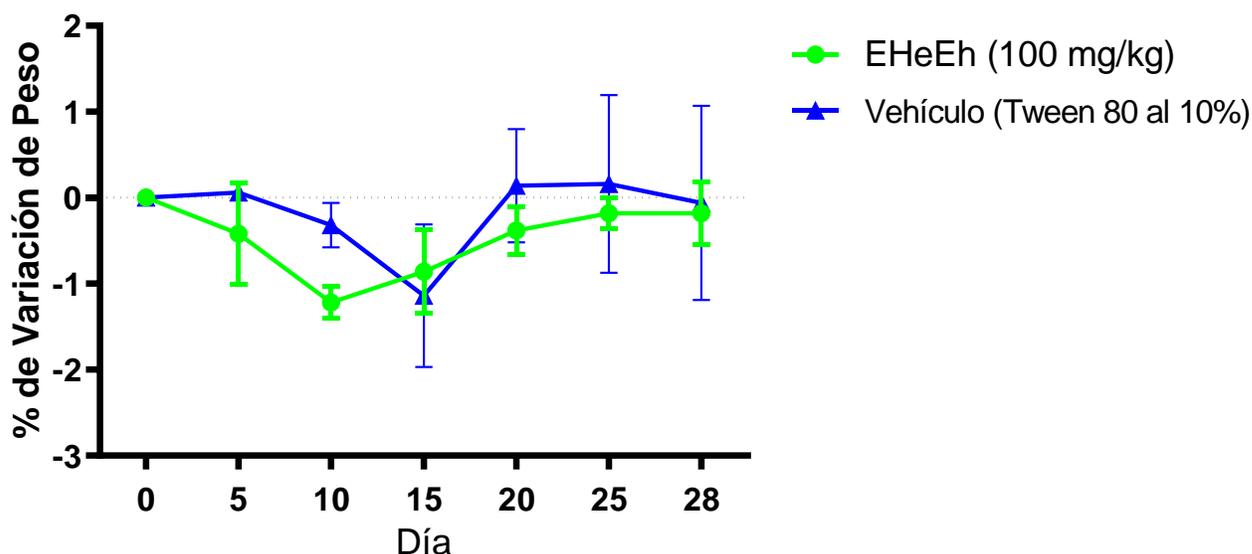
Los estudios de toxicidad subcrónica son definidos por la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos como aquellos destinados a determinar los efectos adversos producidos por exposiciones repetidas, regularmente en un periodo que oscila desde pocos días hasta seis meses (NAS, 177), la importancia de los ensayos de toxicidad radica en establecer su seguridad, dado que a pesar de tratarse de una planta también puede presentar efectos tóxicos, contrarrestando la falsa creencia popular de que lo natural no es tóxico o no genera reacciones adversas, siempre se requieren estudios científicos que respalden antecedentes empíricos.

Estos estudios nos brindan una valiosa información acerca del efecto tóxico acumulativo del EHeEh, los órganos blancos que este afecta, así como la



tolerancia fisiológica y metabólica del extracto a la exposición prolongada mediante el seguimiento de diferentes parámetros.

Durante el periodo experimental no se presentó mortalidad por la administración acumulativa del EHeEh, durante los 28 días del ensayo no hubo cambios de conducta y locomoción entre grupos ni presentaron síntomas o signos tóxicos que pudieran estar relacionados con la administración el extracto; esto atribuirse a una baja toxicidad. Respecto a las curvas de comportamiento de peso corporal durante el periodo de administración del grupo con tratamiento (administrado con EHeEh) en comparación con el grupo vehículo (Tween 80 al 10%) de la Gráfica 18, mostraron comportamientos similares y estadísticamente no significativos, con lo que este indicador no se afectó por la administración del EHeEh durante los 28 días y no hay algún proceso tóxico o de daño aparente, ya que cambios conductuales o el aumento o disminución de peso corporal pueden ser indicios de cambios fisiológicos importantes, que podrían estar relacionados con el daño de algunos órganos, inadecuado funcionamiento hormonal, o incapacidad de absorber nutrientes, entre otros (Antonelli-Ushirobira; 2010).

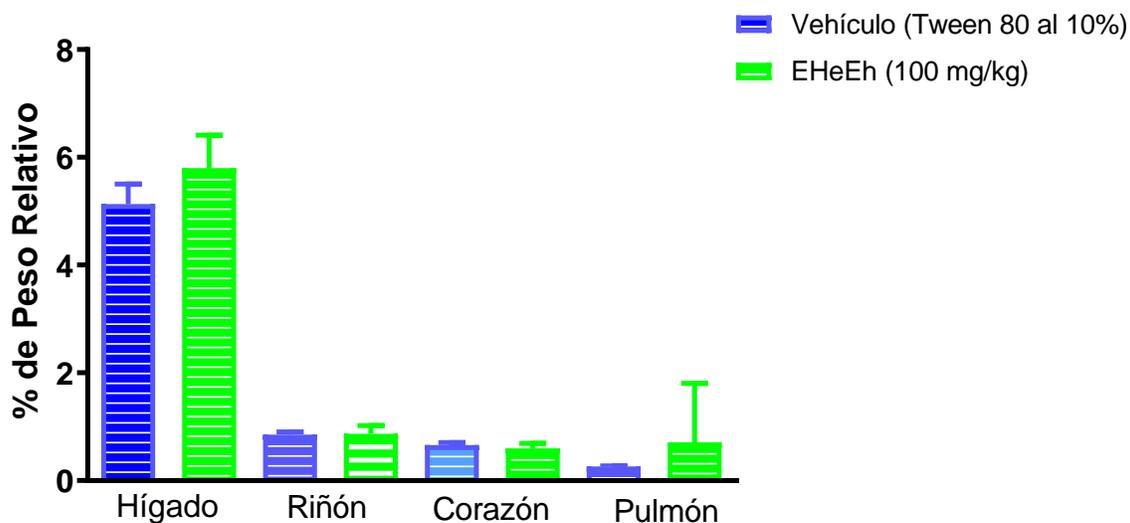


Gráfica 18. Comparación de pesos en grupo con el grupo tratamiento por 28 días administrado con EHeEh una dosis diaria de 100 mg/kg Vs el grupo vehículo administrado con tween 80 al 10%. Los valores corresponden a la media de \pm EEM analizados con la prueba de ANOVA seguida de una prueba POST-HOC de Bonferroni. Vehículo vs Extracto (* $p < 0.05$).



9.7.1 Porcentaje de variación de peso de órganos extraídos: Hígado, Riñón, Corazón y Pulmón.

El metabolismo en términos básicos es el conjunto de reacciones químicas del organismo que tienen como propósito producir energía, sin embargo, dentro de las múltiples funciones del metabolismo se encuentra el proceso de la eliminación de sustancias exógenas, tóxicas o no, por medio de un proceso llamado excreción la cual es la salida del organismo de una sustancia y de sus productos de biotransformación, dicho proceso que se realiza principalmente en el hígado, el cual es encargado de la conversión metabólica de los compuestos extraños (xenobióticos) presentes en el organismo, en donde en algunos casos sólo se metaboliza en el hígado una fracción de la dosis antes de llegar a otros órganos, por lo que también en otros órganos como el pulmón y el riñón hay enzimas capaces de metabolizar xenobióticos (Directora et al., 2008.), de ahí la importancia de los principales órganos metabolizadores en el proceso de excreción de sustancias, los cuales nos permiten obtener información valiosa sobre el efecto a largo plazo del extracto evaluado, por lo que cualquier alteración macroscópicas y/o microscópicas en los mismos podrían hacer índice de un posible daño a nivel celular y funcional (Directora et al., 2008).



Gráfica 19. Porcentaje de peso relativo de Hígado, Riñón, Corazón y Pulmón (vehículo vs EHeEh). Los valores corresponden a la media de \pm EEM analizados con la prueba de ANOVA seguida de una prueba POST-HOC de Dunnett. Vehículo vs Extracto (* $p < 0.05$).



Al término del ensayo toxicológico subcrónico se sacrificaron todos los animales para el examen de órganos: Hígado, Corazón, Riñón y Pulmón mostrado en la Gráfica 19, se presenta la comparación de porcentaje de variación de peso relativo en los diferentes órganos analizados, en donde no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) entre los grupos de estudio ni el vehículo. Así mismo no se reportaron alteraciones macroscópicas en cuanto a superficie, color, consistencia y tamaño., por lo cual no se puede plantear alteraciones de peso de ningún órgano como índice de efectos tóxicos.

9.7.2 Cuantificación de transaminasas

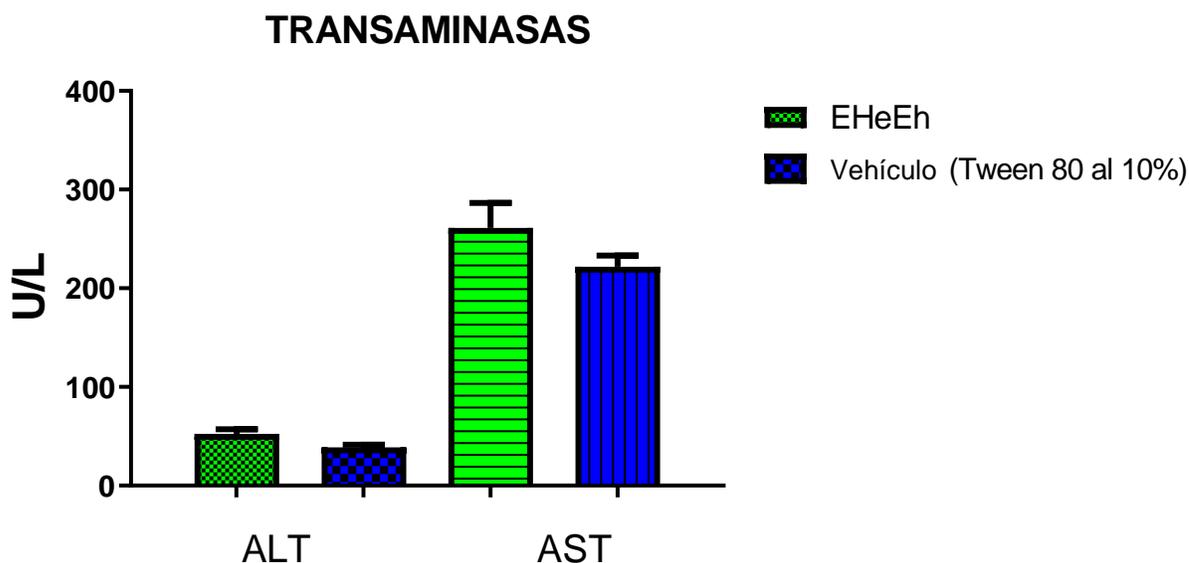
El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica que desarrolla en el organismo. En la práctica clínica diaria, las múltiples funciones hepáticas sólo son superadas por los métodos bioquímicos diseñados para examinarlos. Entre las pruebas que informan lesión hepatocelular o citólisis destacan las transaminasas o aminotransferasas. Estas representan enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido acetoglutarico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico. En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación pero las únicas transaminasas con valor clínico son dos: 1) Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanino aminotransferasa (ALT) (Martín & Molina, 2010) las cuales suelen ser un buen marcador de daño hepático, dado que estas enzimas se encuentran en células hepáticas, por lo que cuando existe algún tipo de daño hepático se encuentran en el torrente sanguíneo con valores plasmáticos elevados.

La enzima ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos, siendo



por lo tanto menos específico que ALT para enfermedades hepáticas, por lo cual, ante la presencia de daño en cualquiera de estos sitios, también elevará su concentración sérica (Martín & Molina, 2010).

Ambas enzimas (ALT y AST) se encuentran de manera normal presentes en bajas concentraciones en el suero con valores inferiores a 40 U/l aproximadamente. La elevación de los niveles séricos de transaminasas suelen indicar una lesión o necrosis de los hepatocitos; no obstante la magnitud de dicha elevación no es directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad y generalmente no tienen valor pronóstico (Alvarez Martínez, 2005). En la Gráfica 20 se representan los valores obtenidos para ALT y AST del grupo vehículo (tween 80 al 10%) vs. el grupo tratamiento (100 mg/kg/día del EHeEh). Los valores normales para el modelo utilizado (cepa de ratones CD1) presentan valores de 28-184 U/l y 55-251U/l para ALT y AST respectivamente (Kaneko, 1989).



Gráfica 20. Comparación de concentraciones de ALT y AST del ensayo toxicológico subcrónico del EHeEh. Los valores corresponden a la media de \pm EEM analizados con la prueba de ANOVA seguida de una prueba POST-HOC de Dunnett. Vehículo vs Extracto (* $p < 0.05$).

Como podemos observar, no se presentaron cambios significativos en ninguno de los dos grupos, adicionalmente los valores se encuentran aparentemente dentro de los rangos normales para el modelo utilizado. Con base a los resultados obtenidos hasta este punto, podemos sugerir que el EHeEh no genera daño



hepático y cardiaco, ya que los valores de ALT se encuentran dentro de los valores normales de referencia y no muestra una diferencia significativa respecto al vehículo, y para la enzima AST a pesar que presenta valores de 10 U/L fuera del rango normal, no presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo vehículo que pueda ser indicio de algún tipo de un daño.

9.7.3 Análisis histopatológico de los órganos extraídos

Adicionalmente, y como parte de la evaluación toxicológica, se llevó a cabo un estudio de histopatología en los principales órganos metabolizadores (Figura 11-14) en los cuales se pudiese generar un daño como resultado de la administración del extracto.

El estudio histopatológico mostró alteraciones en hígado (Figura 11) tales como la necrosis de algunos hepatocitos, sin embargo, dichas alteraciones no pueden atribuirse al efecto del EHeEh ya que se observaron en todos los animales, incluyendo al grupo control.

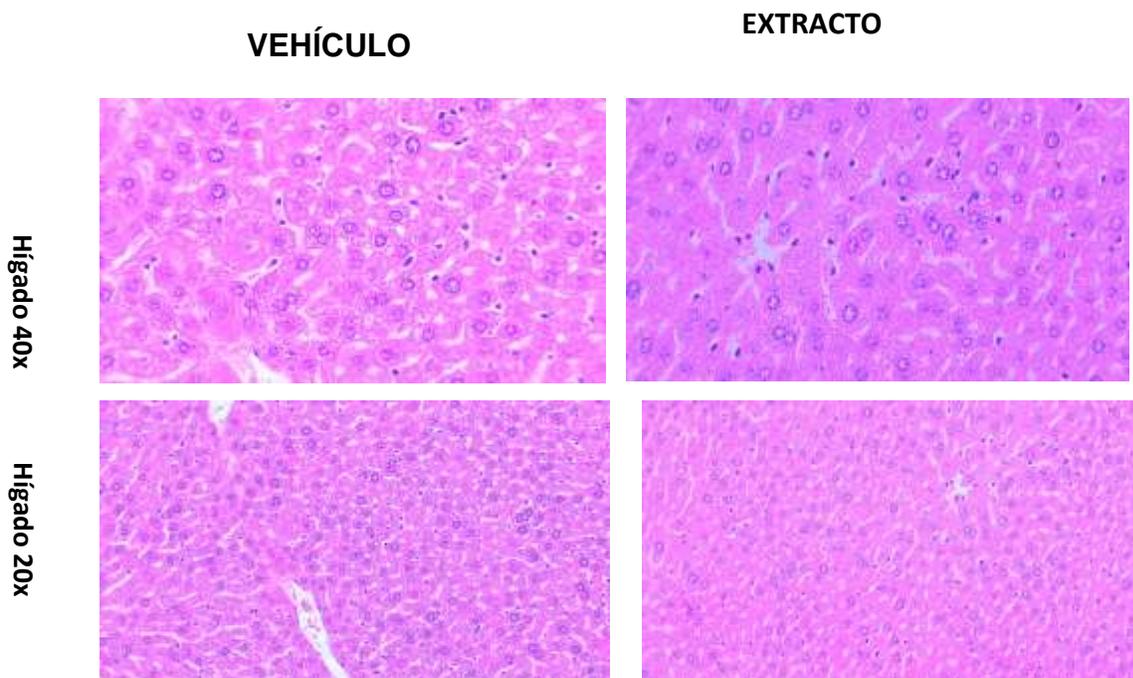


Figura 11. Histología del Hígado, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 40X y 20X. Los órganos fueron disecados y fijados en formalina al 10% durante 24 h y teñida con la técnica de hematoxilina y eosina.



VEHÍCULO

EXTRACTO

Corazón
20x

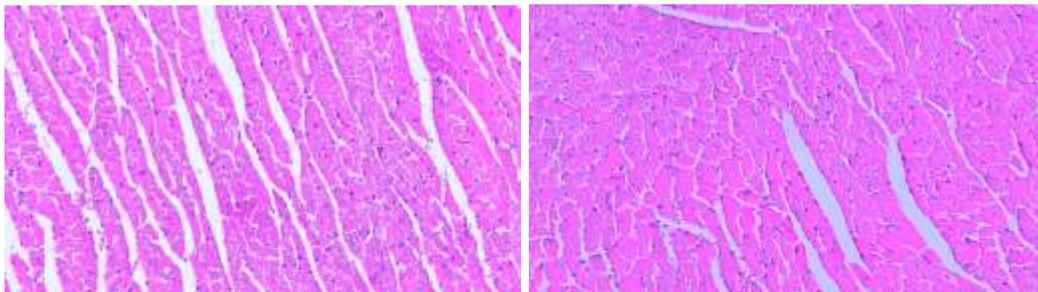


Figura 12. Histología del Corazón, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 20X.
Los órganos fueron disecados y fijados en formalina al 10% durante 24 h y teñida con la técnica de hematoxilina y eosina.

VEHÍCULO

EXTRACTO

Riñón
20x

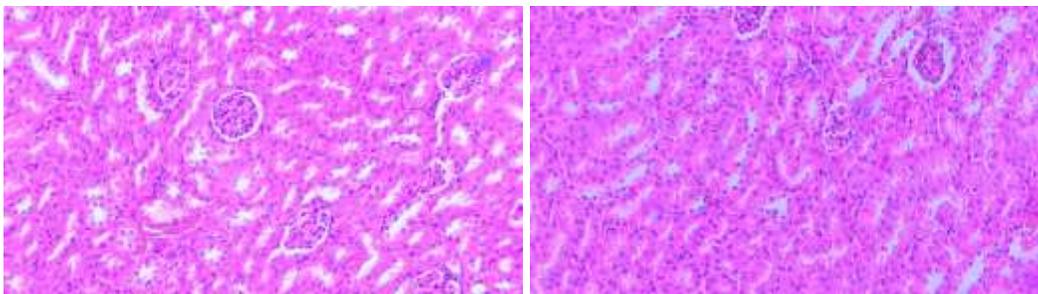


Figura 13. Histología del Riñón, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 20X.
Los órganos fueron disecados y fijados en formalina al 10% durante 24 h y teñida con la técnica de hematoxilina y eosina.

VEHÍCULO

EXTRACTO

Pulmón
20x

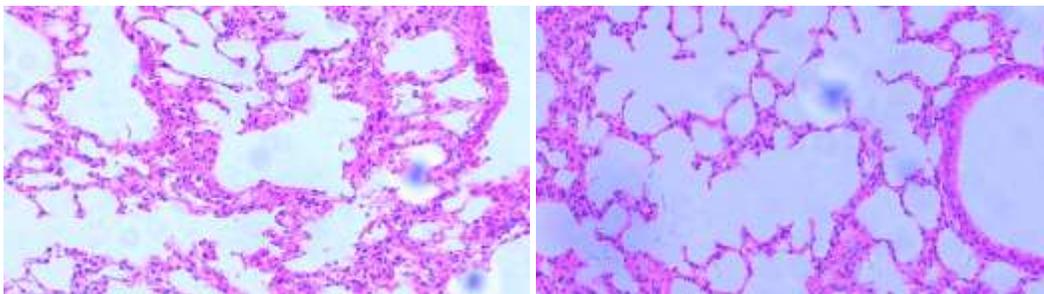


Figura 14. Histología del Pulmón, corte transversal. (Vehículo vs EHeEh), observado a 20X.
Los órganos fueron disecados y fijados en formalina al 10% durante 24 h y teñida con la técnica de hematoxilina y eosina.



Con base a los resultados obtenidos en los estudios toxicológicos, podemos concluir que el extracto no mostró toxicidad significativa en el ensayo agudo y sub-crónico. La administración sub-crónica de 100 mg/kg durante un periodo de 15 días, no provocó efectos tóxicos significativos reflejándose un comportamiento normal de peso, consumo de alimentos y ausencia de signos tóxicos y mortalidad atribuible al EHeEh. Por otra parte, las afectaciones observadas del tejido hepático mediante los estudios histológicos tuvieron una incidencia muy baja en los grupos que presentaron alguna alteración, incluido el grupo control que también tuvo las mismas incidencias. Por lo tanto, se puede plantear que los estudios de toxicidad realizados en las condiciones previamente descritas del EHeEh no demostró efectos tóxicos que pudieran asociarse a su administración, porque el comportamiento de los animales y los indicadores evaluados no resultaron afectados así como tampoco las alteraciones microscópicas.

9.8 Parte Química

A partir del material seco y molido de *E. heterophyllum* (250g) de cada una de las colectas de planta adquiridas, se obtuvieron los extractos orgánicos: hexánico, metanólico y diclorometánico, las cantidades y rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Rendimientos de los extractos obtenidos de *E. heterophyllum*

Planta	Extracto	Cantidad de extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
<i>Eryngium heterophyllum</i>	Hexánico (EHeEh)	2.7	1.1
	Diclorometánico (EDiEh)	6.4	2.5
	Metanólico (EMeEh)	10.7	4.2



9.9 Cromatografía de los extractos orgánicos de *E. heterophyllum*

Los extractos orgánicos de las dos colectas de la planta medicinal *E. heterophyllum* contiene compuestos de diferente polaridad, como se observa en la figura 15, así mismo se puede establecer la abundancia y la complejidad en la mezcla de compuestos que están contenidos en cada extracto a través de la cromatografía de capa fina realizada con los mismos.

De manera cualitativa podemos observar la diferencia de los metabolitos presentes de un extracto hexánico en comparación con el resto más polares, incluso podemos observar una diferencia de componentes entre extractos hexánicos de las diferentes colectas, en el cual la colecta 1 presentó una cantidad mayor de metabolitos (*Figura 16*).

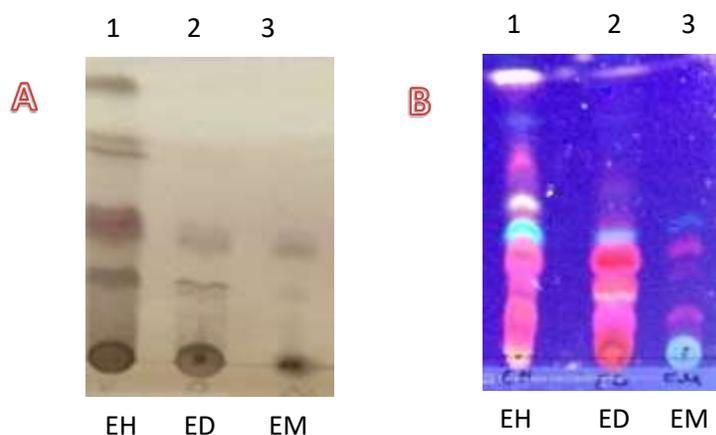


Figura 15. Placas cromatograficas de extractos orgánicos de *E. Heterophyllum*, en el carril 1 se encuentran los extractos hexánicos, en el carril 2 el extracto diclorometánico y en el carril 3 el extracto metanólico. **3A** placa cromatografica en un sistema Hexano/Diclorometano (50:50) revelada con sulfato serico. **3B** placa cromatografica en un sistema Hexano/Diclorometano (50:50) observada en UV.

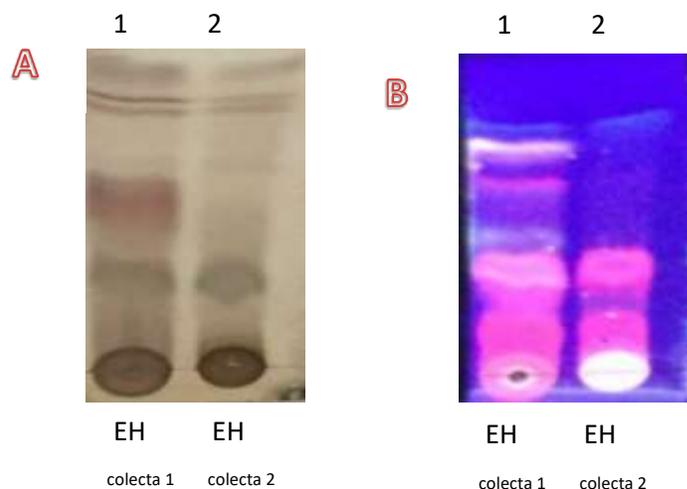


Figura 16. Placas cromatograficas de extractos orgánicos de *E. Heterophyllum*, en el carril 1 se encuentra el extracto hexánico de la colecta 1 (Chiapas), en el carril 2 el extracto hexánico de la colecta 2 (Morelos). **3A** placa cromatografica en un sistema Hexano/Diclorometano (50:50) revelada con sulfato serico. **3B** placa cromatografica en un sistema Hexano/Diclorometano (50:50) observada en UV.



10. Conclusiones



1. El extracto hexánico de *Eryngium heterophyllum* (EHeEh) presentó un efecto vasorrelajante estadísticamente significativo de ~ 86.21 % de relajación en los ensayos *in vitro*, dependiente de la concentración e independiente de la presencia de endotelio, dicho extracto ejerce su efecto en el músculo liso a través de un mecanismo por un bloqueo de canales de calcio tipo L.
2. Relacionado con los resultados del efecto vasorrelajante, el EHeEh mostró una disminución estadísticamente significativa a la hora 3 y 7 post administración en la presión diastólica en un modelo antihipertensivo en ratas SHR.
3. Con base a los resultados obtenidos en las curvas de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar normoglucémicas y en los ensayos antidiabéticos agudos a una dosis de 100 mg/kg., concluimos que el extracto hexánico de *E. heterophyllum* presenta efectos antihiperoglucémicos y antidiabéticos significativos en los modelos empleados, sugiriendo la participación de un posible mecanismo insulino-sensibilizador.
4. El EHeEh presentó una disminución estadísticamente significativa en los niveles totales de colesterol, triglicéridos y LDL en el ensayo de la determinación de los perfiles bioquímicos.
5. Adicionalmente, el EHeEh se encuentra en la categoría 4 de acuerdo a SGA por poseer una DL_{50} mayor a 2000 mg/kg del estudio de toxicidad aguda, mientras que el ensayo subcrónico tampoco mostró efecto tóxico aparente a la dosis experimentada. Por otro lado, de acuerdo a los resultados del examen de transaminasas se encuentran dentro de los valores normales para ratón macho de la cepa CD1 y no se observó algún daño aparente en los órganos analizados histopatológicamente.



11. Perspectivas



Este proyecto da la pauta para continuar el análisis de algunos efectos farmacológicos, como se muestra a continuación:

Continuar con el análisis por RT-PCR de los órganos extraídos del ensayo antidiabético sub-agudo (hígado, tejido adiposo y músculo esquelético), de los cuales hasta ahora se ha obtenido el RNA de las muestras para establecer la expresión de genes que codifican para las proteínas asociados a la sensibilización de insulina y diabetes.

Determinar la expresión y la activación de PPAR- α , PPAR- γ , Adiponectina, PTPn1, GLUT-4 y β -actina (gen constitutivo).



12. Referencias



- McAlister FA, Zarnke KB, Campbell NR, et al. The 2001 Canadian recommendations for the management of hypertension: Part two--Therapy. *The Canadian Journal of Cardiology*. 2002 Jun;18(6):625-641.
- American Diabetes Association: report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2007; 24:S5-S20.
- Porks, P., Antcliff, J. F., Lippiat, J., Gloyn, A. L., Hattersley, A. T., Ashcroft, F. M. (2004) Molecular basis of Kir6.2 mutations associated with neonatal diabetes or neonatal diabetes plus neurological features. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 50, 17539- 17544.
- Olivares, J. A., Arellano, A. (2008) Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de educación bioquímica* 27, 9-18.
- Castrejón V; Carbó R; Martínez M. (2007) Mecanismos Moleculares que Intervienen en el Transporte de la Glucosa.; 26(2): 49-57.
- Brandan, Nora C., Llanos, I.C., Miño, C.A., Rodríguez (2011), A. Hormonas pancreáticas. *Cátedra de Bioquímica* 1-17.
- Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/718GER.pdf> (Consultado el 28 de agosto del 2017).
- Mosso, D., (2015) "Diseño, síntesis y acoplamiento molecular de derivados de N-[4- (benciloxi)bencil]leucina como ligandos duales PPAR α/γ ". Tesis de licenciatura. Facultad de Farmacia. UAEM.
- Alemán, G. D. Tamay, C. F Álvarez, A. S.; Mendieta, W. J.(2016) Current Advances in the Biochemical and Physiological Aspects of the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus with Thiazolidinediones. *PPAR Research*..
- DeFronzo, R. A. Ferrannini, E. Groop, L. Henry, R. R. Herman, W. H. Holst, J. J. Hu, F. B. Kahn, C. R. Raz, I. Shulman, G. I. Simonson, D. C. Testa, M. A. Weiss, R. (2015) Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews*., 1, 5019. +
- Carrasco N.F., Galdani FJE., Reyes M.(2013), Insulin resistance síndrome: diagnosis and management. *Revista Médica Clínica Las Condes, Endocrinología*, 827-837.
- Pollak, F. (2016), Resistencia a la insulina: Verdades y controversias. *Revista Médica Clínica Las Condes* 27, 171-178.
- American Diabetes Association (2019): Clasificación y diagnóstico de la diabetes: Estándares para la Atención Médica de la Diabetes. *Diabetes Care* 42, 13-28.
- Alemán-González-Duhart, D., Tamay-Cach, F., Álvarez-Almazán, S. y Mendieta-Wejebe, JE (2016). Avances actuales en los aspectos bioquímicos y fisiológicos del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 con tiazolidinedionas. *Investigación*, 2016 , 7614270.
- Castaño-Guerra R, Medina-González M, Rosa-Rincón R, Loría-Castellanos J. (2011). Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Instrumentos clínicos*,1-10.
- Tagle Rodrigo (2018) Diagnóstico de hipertensión arterial. *Revista Médica, Fronteras de cardiología*, (29, 12,20).



- Alfaro J, Simal A, Botella F. (2000), Tratamientos de la diabetes mellitus, del Sistema Nacional de Salud, Madrid 24 (2), 33-43
- Native Plant Information Network, NPIN (2013). Published on the Internet <http://www.wildflower.org/plants/> [accessed: 12/24/2014] Lady Bird Johnson Wildflower Center at The University of Texas, Austin, TX..
- Acosta, E. (2012). Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquímica Clínica*, 46 (2): 183-194
- Angélica Flores-Flores, Oswaldo Hernández-Abreu, María Yolanda Rios, Ismael León-Rivera, Berenice Aguilar-Guadarrama, Patricia Castillo-España, Irene Perea-Arango, Samuel Estrada-Soto. (2016). Vasorelaxant mode of action of dichloromethane-soluble extract from *Agastache mexicana* and its main bioactive compounds. *Pharmaceutical Biology* 54(12), 2807-2813.
- Aguirre-Crespo F., Vergara-Galicia J., Villalobos-Molina R., López-Guerrero J.J., Navarrete-Vázquez G., Estrada-Soto S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences* 79, 1062-1068).
- Ramírez, M. y Sánchez, C. (2012). El factor de necrosis tumoral- α , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutrición Hospitalaria*
- Salazar, A. M.; Sandoval, A.S. & Armendáriz, J.S., (2013). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*.
- Sánchez Flores, J. (2016). Evaluación del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) para comprobar su actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria. *Licenciatura en Química Farmacéutica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza - UNAM*.
- Estrada E. (2012) *Formulas Herbolarias Erick Estrada*». www.erickestrada.com. Consultado el 23 de febrero de 2016.
- (2012) *Estudio del extracto etanólico de Eryngium heterophyllum (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria*». *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2012.
- Lylia G. Miranda Velásquez, Azucena Oranday Cárdenas, Abelardo Chavez Montes, Mireya A. Villanueva Cuéllar, Gerardo Lozano Garza, Delia E. Cruz Vega (2006). Actividad hipocolesterolemica de extractos de *Eryngium heterophyllum*.
- *ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD CASTELLANADE CARDIOLOGÍA Hipertensión arterial (II)(2003) 2.ª ÉPOCA: Vol. V NÚMERO 4*
- Lozano Jiménez, Y. Y., & Sánchez Mora, R. M. (2020). Canales de calcio como blanco de interés farmacológico. *Nova*, 18(34), 57–76.
- Trujillo Arriaga H.M. (2007). La curva de tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo. *ACADEMIA, Accelerating the world's research* 64, 21–24.
- Rolla, A. (2003). Terapia de la resistencia insulínica. *Medwave*, 3(9).
- Lahsen M, R., & Liberman G, C. (2003). PREVENCIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 2. *Revista Chilena de Nutrición*, 30(2).
- Martín, M., & Molina, A. (2010). *Transaminasas: Valoración y significación clínica*.



- Directora, D., Capítulo, E., Silbergeld, Sumario, S., Ellen, I., Holmberg, B., & Högberg, J. (2008.). *TOXICOLOGIA HERRAMIENTAS Y ENFOQUES Definiciones y conceptos*.
- Araya-Orozco, M. (2004). Hipertensión arterial y diabetes mellitus. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 25(3-4), 65–71.
- Esquivel, E. R., Noriega, R., Bello, M. A., Saavedra, A., Salgado, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*, 14(1), 45–52.
- Carreón-Sánchez R., Marroquín- Segura R., Mora-Guevara J.L.A., Valadez-Sánchez C. S., Flores-Cabrera Y., Flores-Pimentel M., Hernández Abad V.J. (2013). Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar s actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 44 (2).
- Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(2), 135–148.
- Kuklinski C. (2000) . Libro de farmacognosia
- Mata P. (2004) *Hiperlipemias y riesgo cardiovascular*. 2 (VI) 2.
- Hall, J. E. (2015). *Guyton y hall libro de texto de fisiología médica* (13ª edición). W B Saunders.
- Zapata-Bustos (2009). *Mecanismos Moleculares del Efecto Hipoglucemiante de Plantas Usadas Tradicionalmente como Antidiabéticos*. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica de División de Biología Molecular. 28-30.
- Saavedra, M., Ramírez Sánchez, Israel, García Sánchez, José Rubén, Guillermo, R., & Méndez Bolaina, Enrique. (2012). Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(2), 7–22.
- Jaime, Mendoza, L., Juan, H., Ventura, N., Asesor, N., Luz, M., & Lazo Jiménez, J. (2017). *Para optar el Título Profesional de Licenciados en*. Retrieved from <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/51117/NUMehujl.pdf?sequence=1>
- Palá Paúl Jesús (2002) Tesis Doctoral Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “*Eryngium*” L, en la Península Ibérica. Universidad Complutense de Madrid.
- Antonelli-Ushirobira, T. M., Kaneshima, E. N., Gabriel, M., Audi, E. A., Marques, L. C., & Mello, J. C. P. (2010). Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1817–1820. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.013>

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

Nombre del alumno: Kenia Xitlaly Salazar Lezama

Título de la tesis: "Determinación de los efectos antidiabético, antihipertensivo y toxicológico de *Eryngium heterophyllum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Germán Bernal Fernández

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

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2022-03-31 21:25:49 | Firmante

sUHS4eEwybvxv2Jm7QS3Y1qVR6menGgLCK3YnKs4u1K3YbWwAabSlnqEILv8+YJpkH5nQvgOPfqqfe/i+XfZsOGVQRIRMsdlEP6ZSs/kLQbuhMmUjbar7tzZ2HnK3dKsrUXYF/rQlz6zwzJcAK83Z+RmMgAdoljpHeGsiY2VVLW/lrRPFUeYSMRYCqHi4S3P23VpshAUJ37oui18fg1ZMav6NNXwmLsAAyvjY5Jxyh1SGE2bkEW8iRuOu8vww7gX9VCy8Qt6pzltGIhUciPgXhhvW7U7tePPKD7MnQEV+Ob9GI132MAPFhmKUXEj9jkaglxhYcvMG4ISRT7qhXB4CuQ==

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



[7oFwLsOxR](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Zr3qKunPOON07ljNX9gbV4xi5cmuibZA>



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

Nombre del alumno: Kenia Xitlaly Salazar Lezama

Título de la tesis: " Determinación de los efectos antidiabético, antihipertensivo y toxicológico de *Eryngium heterophyllum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Cairo David Toledano Jaimes

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

CAIRO DAVID TOLEDANO JAIMES | Fecha:2022-04-03 14:55:46 | Firmante

gbUAsdbWq0JotrzBMhfmY1E5ha0qRAF7riG2q0wG4BwSYY2FKD3LyEKGublpoBx2+GvZRy6eb9NRdlDg1tgd/VJJ7RaWNOI9iNOJgCxFeRYWIVq0osV4pPj4T/gV8xWp7Yuzqz/k3IH2sH5EqA0kfybPX88ggL8jpnEOWAmDJxfOtUwK660Rk5NPoc8AsbV+AaypU5jQdjLs1wWsSQG1NOnw0f5Is2pWrP/oUMx/3bAFRuPwMQZ1Twd/MarPQJ17Wm9enWomyswXVxRIRRObQmPYD5xOYZtoqptQXh9NPoVNRcnLGg2Dqej2q2LA9ymmRVLQf2aOdLc91zcG7c3Acg==

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



[aAoKCjclU](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EXIVInQFI9hWoFRgppCg0islQTBf8ay2>



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

Nombre del alumno: Kenia Xitlaly Salazar Lezama

Título de la tesis: " Determinación de los efectos antidiabético, antihipertensivo y toxicológico de *Eryngium heterophyllum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César 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:2022-03-31 22:13:11 | Firmante

LUXlE00zTjXi//EiYgu9zb34Er2AJPMmzDfk01ItRM2sd4b4BKn8gPcYFcOzFjbA/Q5DZQEtl01om5718C1jjDcCzUuL8dWf7TFWrTomKHSDq4Vp4yIPlh7CPOyjm6KgtuTZ1yMGiLKSdoh52Tq4d1VxtMgllebzbG/mRIky7TiUTG+3gQk2mbA+Q6HSJRzLs6GvedtVJN5uUyGAg0g4bjxzJ2eP0Pevk1IVR11dNP5Te2g5JuCavr+ol+4W/7bN5MLQUJbVC1J21FYtZkOzd4Hx1eRoHV/Tx+A5wOMjA7AS2F2VbEvWu41Ui2x5CXbjBh22ePmwPBXeVIMI4643cWg==

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



FemSkVGhM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/z2ROtL5zg1Pm6haNM6aaMnLXG5rNjyOJ>



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

Nombre del alumno: Kenia Xitlaly Salazar Lezama

Título de la tesis: "Determinación de los efectos antidiabético, antihipertensivo y toxicológico de *Eryngium heterophyllum*"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Antonio Monroy Noyola

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

ANTONIO MONROY NOYOLA | Fecha:2022-04-05 11:19:55 | Firmante

VBnn9yc1QgF624laxGdaHtmu6Zp8XQkw/ns5pVAa7A9colS3N+kye5weqUC6K/up5jk7Axbt+EvoXjH4cyCZfBbaLYJm48JqWTO6shkoZpuZPWiuXgKkGlnVPdnFFWHdPXpRCHWLvEici8cPSiU+M0QRtzNIDVGTfVYabqWS/9YXa+1ouGJAb3Unr5Ks97BvVoQ9RQn4fwA5ns5ldqRghz40PBN6NgvGx+cj/qVfkiQ+ks9WlKPxYkLL+swldT4DCq7nJHZ9unjalZ+hXyVBpiw0u9n/mEwI567MJ8Las5ETo4Z/fK4V0Rqkq1C7oR0tVwKf1fwlEwwPIIfTv+UlfQ==

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



[DIAPb7Im5](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QF30Q9VVY48BazmyqGFDtiaRHNI4E9c3>



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

Nombre del alumno: Kenia Xitlaly Salazar Lezama

Título de la tesis: " Determinación de los efectos antidiabético, antihipertensivo y toxicológico de *Eryngium heterophyllum*"

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:2022-03-31 20:21:44 | Firmante

nCWysVr3qW1KsCCi/z8e9FKWBeFyz0TZYSCFqhnprArAj2NemTwixcVFFLeFN0v8hT22Qvlyg5ZT9/zjsazLed3/eXTcWKwdQL8y7zm9H80k+X0FXEO2v1jg8gO8xdiybt8a0PghbfpIhZwVVS6XDOHNBnllFibNQODuTSKRmb3mYAJyY8vpAipZe7IOg5bpdkRUzaefvhvL9ImAt73VVwAwNh7wCJsrrz9O5I5gfQOoMKsrUNbSCoSt3ecbmoOTi7YwXVN3oeidHrSm98UbSBVBTb0ZhS9O5bi0AwuVVRjh1NDgXZGdCqYQob1JT762RV0i9ZMp+fGYdAs3ObfQd75Sg==

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



AmF8EhX6B

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/N6s8t5tBHiJ3nydJhaQcSy4DF4sxLMA8>

