



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS



**“ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO
Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea
millefolium* y *Plantago australis* COMO
POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN FARMACIA

PRESENTA:

M.F. FABIOLA CHÁVEZ SILVA

Co-DIRECTORES DE TESIS:

Dr. SAMUEL E. ESTRADA SOTO

Dr. J. GABRIEL NAVARRETE VÁZQUEZ

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia (UAEM), por la infraestructura y facilidades brindadas en los estudios de posgrado.

A CONACYT por la beca otorgada (378047) para realizar los estudios de Doctorado y por la beca de movilidad FOMIX (2013-1#224038).

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Sara García Jiménez, Dr. Julio César Almanza Pérez, Dr. Gabriel Navarrete Vázquez y Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por todas sus aportaciones que permitieron enriquecer este proyecto de investigación y fomentaron mi desarrollo profesional.

Al Dr. Julio César Almanza Pérez por todos los conocimientos compartidos y por su valiosa colaboración en la realización de los experimentos de expresión de PPAR γ y GLUT-4 y de secreción de insulina y movimiento de calcio. Lo admiro y respeto.

Al Dr. Guillermo Ávila Ramírez por las facilidades brindadas para llevar a cabo los ensayos de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.

A la Dra. Irene Perea Arango por la disponibilidad para realizar la colecta e identificación taxonómica de las especies vegetales empleadas en este proyecto.

Al Dr. J. Gabriel Navarrete Vázquez co-director de este proyecto por su apoyo, por todas sus aportaciones para enriquecer este proyecto. Y por compartir sus conocimientos y ser parte de mis aprendizajes.

Al Dr. Samuel E. Estrada Soto director de este proyecto por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por compartir sus conocimientos y permitirme crecer como profesional. Por la libertad, confianza y apoyo que siempre me ha brindado.



DEDICATORIAS

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
INDICE	3
Índice de Tablas.....	5
Índice de figuras.....	¡Error! Marcador no definido.
Índice de gráficas.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Diabetes mellitus	2
2.2. Epidemiología de la Diabetes	4
2.3. Insulina: síntesis, secreción y señalización.....	7
2.4. Patogénesis de la diabetes tipo 2	13
2.5. Diagnóstico de diabetes tipo 2	21
2.6. Tratamiento de la Diabetes tipo 2	23
2.6.1. Medicina tradicional.....	26
2.7. Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de DT2.....	28
2.7.1. <i>Plantago australis</i> Lam. subsp. <i>hirtella</i> (Kunth) Rahn.....	29
2.7.2. <i>Achillea millefolium</i> L.	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	34
4. HIPOTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general	36
5.2. Objetivos específicos.....	36
6. METODOLOGÍA.....	37
6.1. Recolección y preparación del material vegetal	37
6.2. Obtención de los extractos orgánicos	37
6.3. Evaluaciones farmacológicas: ensayos <i>In vivo</i>	38
6.3.1. Uso y manejo de animales.....	38
6.3.2. Curva de tolerancia a glucosa y sacarosa	38



6.3.3.	Diabetización	39
6.3.4.	Determinación del efecto antidiabético agudo.....	39
6.4.	Estudio toxicológicos	40
6.4.1.	Toxicidad aguda	40
6.4.2.	Toxicidad subcrónica	41
6.5.	Evaluaciones farmacológicas: ensayos <i>In vitro</i>	42
6.5.1.	Ensayo de inhibición de las enzimas α -glucosidasas.....	42
6.5.2.	Determinación de la expresión relativa de RNAm.....	43
6.5.3.	Movimiento de Calcio	45
6.5.4.	Determinación de secreción de insulina.....	46
6.6.	Análisis estadístico	47
6.7.	Estudio fitoquímico preliminar	47
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1.	Parte farmacológica: Evaluaciones <i>in vivo</i>	49
7.1.1.	Curvas de tolerancia a la glucosa	49
7.1.2.	Curvas de tolerancia a la sacarosa	53
7.1.3.	Ensayo antidiabético agudo.....	56
7.2.	Parte farmacológica: Evaluaciones <i>in vitro</i>	58
7.2.1.	Evaluación de la inhibición de α -glucosidasas intestinales	58
7.2.2.	Determinación de la expresión relativa de RNAm de PPAR γ y GLUT-4.....	60
7.2.3.	Secreción de Insulina y movimiento de calcio.....	64
7.3.	Parte toxicológica	67
7.3.1.	Toxicidad aguda	67
7.3.2.	Toxicidad subcrónica	69
7.4.	Parte Química.....	72
7.4.1.	Perfil fitoquímico preliminar.....	72
8.	CONCLUSIONES	75
9.	PERSPECTIVAS	76
10.	REFERENCIAS.....	77
	ANEXOS.....	86



Índice de tablas

Tabla 1. Los 10 países con mayor gasto sanitario total en diabetes en 2017 (20 a 79 años).....	6
Tabla 2. Principales causas de muerte en México, 2013.....	7
Tabla 3. Principales grupos de fármacos empleados en el tratamiento de diabetes.....	21
Tabla 4. Categorías de peligro de toxicidad aguda por ingestión y elementos que deben figurar en la etiqueta (modificado de SGA. 2011).....	68
Tabla 5. Ensayo de toxicidad aguda.....	69
Tabla 6. Rendimientos de los extractos obtenidos.....	71
Tabla 7. Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna abierta.....	71
Tabla 8. Desplazamiento químicos obtenidos y reportados para leucodina.....	73



Índice de figuras

Figura 1. Principales complicaciones de la diabetes.....	2
Figura 2. Clasificación de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes.....	3
Figura 3. Número de personas con diabetes en el mundo y por región en 2017 y 2045 (20-79 años).....	5
Figura 4. Síntesis de insulina.....	8
Figura 5. Señalización de la insulina: efectos biológicos.....	9
Figura 6. Secreción de la insulina de las células β pancreáticas.....	10
Figura 7. Estructura del receptor de insulina (RI).....	11
Figura 8. Señalización de la insulina.....	12
Figura 9. Factores involucrados en el desarrollo de la DT2.....	13
Figura 10. Progresión de la insulino deficiencia en diabetes tipo 2 (DT2).....	14
Figura 11. Relación entre la obesidad y desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardíacas.....	15
Figura 12. Composición del tejido adiposo de personas delgadas y obesas.....	15
Figura 13. Asociación de obesidad con la inflamación crónica de bajo grado y desarrollo de la RI.....	16
Figura 14. Principales mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la resistencia a la insulina.....	17
Figura 15. Criterios de diagnóstico de la diabetes tipo 2.....	19
Figura 16. Grupos de antidiabéticos orales de acuerdo a su efecto farmacológico.....	21
Figura 17. Familias botánicas con la mayor cantidad de especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el control de Diabetes mellitus.....	26
Figura 18. Fotografía de <i>Plantago australis</i>	26
Figura 19. Fotografía de <i>Achillea millefolium</i>	28
Figura 20. Diagrama general de trabajo.....	34



Figura 21. Curva de tolerancia a la glucosa y sacarosa en ratones normoglucémico.....	36
Figura 22. Diabetización de ratones normoglucémicos.....	37
Figura 23. Esquema del ensayo antidiabético agudo.....	37
Figura 24. Esquema del ensayo toxicológico agudo.....	38
Figura 25. Esquema del ensayo toxicológico subcrónico.....	39
Figura 26. Ensayo de inhibición de enzimas α -glucosadasas <i>in vitro</i>	40
Figura 27. Determinación de la expresión relativa de GLUT-4 y PPAR γ en fibroblastos 3T3-L1.....	43
Figura 28. Cuantificación de insulina y movimiento de calcio.....	45
Figura 29. Determinación del perfil fitoquímico preliminar.....	46
Figura 30. Efecto del EHiAm en liberación de $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5F.....	66
Figura 31. Micrografías de los principales órganos metabolizadores con tinción de hematoxilina (HE).....	70
Figura 32. Cromatografía en placa fina de las fracciones Am-C, Am-D, Am-E y de la fase orgánica de la extracción del EHiAm (eEHiAm).....	72
Figura 33. Mecanismos de acción involucrados en el efecto antidiabético de <i>A. millefolium</i>	74

Índice de gráficas

Gráfica 1. Curva de Tolerancia a la Glucosa del extracto etanólico de <i>P. australis</i>	48
Gráfica 2. Curva de Tolerancia a la Glucosa del extracto hidroalcohólico de <i>P. australis</i>	49
Gráfica 3. Curva de tolerancia a la glucosa del extracto etanólico de <i>Achillea millefolium</i> (EEAm).....	50
Gráfica 4. Curva de tolerancia a la glucosa del extracto hidroalcohólico de <i>A. millefolium</i> (EHiAm).....	51
Gráfica 5. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto etanólico de <i>P. australis</i>	52
Gráfica 6. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto hidroalcohólico de <i>P. australis</i>	53
Gráfica 7. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto etanólico de <i>A. millefolium</i>	54
Gráfica 8. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto hidroalcohólico de <i>A. millefolium</i>	55
Gráfica 9. Ensayo antidiabético agudo del EHiAm.....	56
Gráfica 10. Ensayo antidiabético agudo a distintas dosis del EHiAm.....	57
Gráfica 11. Inhibición de α -glucosidasas de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos..	58
Gráfica 12. Determinación de la expresión de PPAR γ en células 3T3-L.....	62
Gráfica 13. Expresión de GLUT-4 en células 3T3-L1.....	63
Gráfica 14. Liberación de insulina en células RINm5F.....	65
Gráfica 15. Liberación de [Ca ²⁺] _i en células RINm5F.....	66
Gráfica 16. Variación de peso de los ratones tratados con EHiAm con respecto al grupo vehículo durante 28 días de tratamiento.....	69
Gráfica 17. Variación de peso relativo de los principales órganos metabolizadores tras 28 días de tratamiento.....	69
Gráfica 18. Valores de transaminasas (ALT y AST) después de 28 días de tratamiento.....	70

ABREVIATURAS

11 β -HSD1	11 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
ADA	American Diabetes Association
ADP	Difosfato de adenosina
AKT	Proteína cinasa B
ATP	Trifosfato de adenosina
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Calcio intracelular
CI50	Concentración inhibitoria 50
DL50	Dosis letal 50
DT2	Diabetes tipo 2
DAG	Diacilglicerol
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
FMD	Federación Mexicana de Diabetes
g	Gramos
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT	Transportador de glucosa
GLUT-2	Transportador de glucosa tipo 2
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
i.p.	Administración intraperitoneal
IRS	Sustrato del receptor de insulina
Kg	Kilogramos
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μ	Microlitros
NaCl	Cloruro de sodio
NO	Oxidó nítrico
OMS	Organización Mundial de la salud
PGC1	Prostaciclínas tipo 1
pH	Potencial de hidrógeno
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
p.o.	Administración oral, <i>per os</i>
PPAR γ	Receptor de proliferación activado por peroxisoma y
PIP ₂	Fosfatidil Inositol bisfosfato
PTP-1B	Proteína fosfatasa de tirosina 1B
PTPs	Proteínas fosfatasa de tirosina
Tyr	Tirosina

RESUMEN

Achillea millefolium y *Plantago australis* son plantas medicinales empleadas en el tratamiento de enfermedades como: problemas inflamatorios, desórdenes gastrointestinales, trastornos respiratorios y diabetes. Con objeto de establecer el potencial antidiabético de estas especies, así como el perfil toxicológico y fitoquímico preliminar del extracto más activo, se evaluaron los extractos etanólico e hidroalcohólico de ambas especies.

Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* como curvas de tolerancia a la glucosa (CTG), que nos permitieron observar que los extractos etanólico (EEP_a) e hidroalcohólico (EHIP_a) de *P. australis* e hidroalcohólico de *A. millefolium* (EHIA_m), disminuyeron los picos hiperglucémicos de manera significativa y mostraron un patrón característico de mecanismos insulinosensibilizadores. Adicionalmente, el EHIA_m mostró la posible participación de mecanismos hipoglucemiantes. Se realizaron también curvas de tolerancia a la sacarosa (CTS), donde los extractos: EHIP_a, EEAm y EHIA_m presentaron disminución significativa de la glucemia a las horas 0.5 y 1, esto se atribuye a la inhibición de α -glucosidasas como otro de los posibles mecanismos de acción. Los resultados anteriores dieron pauta para elegir al EHIA_m como el extracto más activo y llevar a cabo el ensayo antidiabético agudo, empleando diferentes dosis (33, 100, 330 mg/kg) a las cuales se observó efecto no dependiente de la dosis, con disminución significativa de la glucemia durante las 7 horas del experimento, esto se atribuye a los mecanismos presentados en la CTG.

Con el fin de corroborar y establecer algunos de los posibles mecanismos de acción implicados en el efecto antidiabético, se realizaron experimentos *in vitro* de inhibición de enzimas α -glucosidasas, observando que todos los extractos inhiben a estas enzimas en un 50%. También se realizaron ensayos de expresión de PPAR γ y GLUT-4, donde los extractos EHIP_a y EHIA_m incrementaron la expresión de estos genes de manera significativa vs. vehículo. Los ensayos de secreción de insulina y cuantificación de calcio mostraron que el EHIA_m favorece la secreción de insulina.

Por otro lado, los ensayos de toxicidad aguda y subcrónica de EHIA_m, de acuerdo a lo establecido por la OECD, no produjeron ninguna muerte a las dosis 5, 50, 300 y 2000 mg/kg, ni daño en los principales órganos metabolizadores (hígado, riñón y corazón) tras la administración diaria (28 días) de 100 mg/kg.



Finalmente, por cromatografía en columna abierta del EHiAm se aisló un compuesto de tipo lactona sesquiterpénica que, presumiblemente, es leucodina.

ABSTRACT

Achillea millefolium and *Plantago australis* are medicinal plants used in the treatment of several pathologies, including inflammatory and spasmodic gastrointestinal disorders, respiratory ailments and diabetes, among others.

With the purpose to establish the potential antidiabetic activity of these species, as well as their toxicological and phytochemistry profiles of the most active ethanolic (EePa) and hydroalcoholic (HAEAm) from both species, they were evaluated in *in vitro* and *in vivo* murine models.

We carry out *in vivo* experiments in the glucose tolerance curves that allowed us to observe that the ethanol (EePa) and hydroalcoholic (EHiPa) extracts of *P. australis*, as well as the hydroalcoholic extract of *A. millefolium* (EHiAm) significantly decreased the hyperglycemic peaks and showed a characteristic pattern of insulin sensitizing mechanisms. Additionally, EHiAm showed the possible participation of hypoglycaemic mechanisms. In sucrose tolerance curves EHiPa, EEAm and EHiAm where decreased glycemic peaks at hours 0.5 and 1, this is attributed to the inhibition of glucosidases as other mechanism of action. These results turned to choose EHiAm as the most active extract and carry out acute antidiabetic trials using different doses (33, 100, 330 mg/kg), to which a non-dose-dependent effect was observed with a significant decrease in glycemia during 7 hours which it is attributed to the mechanisms presented in the glucose tolerance curve.

With the finality of to corroborate and establish the possible mechanisms of action involved in the antidiabetic effect, in *in vitro* experiments of inhibition of α -glucosidase enzymes, observing that all extracts inhibit these enzymes 50%. PPAR expression assays were also carried out. EHiPa and EHiAm extracts increased the expression of PPAR γ and GLUT-4 genes in a significant manner with respect to the vehicle. The insulin secretion and calcium movement assays showed that EHiAm favors this secretion.

On the other hand, tests of acute and sub-chronic toxicity of EHiAm were carried out according to OECD guidelines, in which no deaths occurred at doses 5, 50, 300 and 2000 mg/kg, nor damage to the main metabolic organs (liver, kidney and heart) after daily administration (28 days) of 100 mg/kg. Finally, open-label chromatography of EHiAm was performed, isolating one sesquiterpene lactone-type compounds that presumably is Leucodina.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad crónica no transmisible (ECNT), que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina, lo cual hace que se presente “hiperglicemia” (Córdova-Villalobos et al., 2008; IDF, 2017). Esta enfermedad merma la calidad de vida de los pacientes y sus familias, incrementa el riesgo de muerte y dado el gran número de complicaciones que se suelen presentar, también impacta de manera importante en la economía de los pacientes y los servicios de salud (Hernández-Ávila et al., 2013).

La Federación Internacional de la Diabetes (FID) estima que en el año 2017 había 425 millones de personas en el mundo con este padecimiento, lo que hace que sea un problema de salud pública, siendo el 90% de los casos correspondientes a diabetes tipo 2 (DT2) (IDF, 2017).

Actualmente, el tratamiento para esta enfermedad incluye cambios en el estilo de vida de los pacientes; así como, terapia farmacológica que incluye varios grupos de fármacos cuyo principal objetivo es disminuir y controlar la glucemia (Troncoso et al., 2013). Sin embargo, la poca actividad física, malos hábitos alimenticios y la falta de adherencia al tratamiento hacen que los pacientes no presenten un control adecuado de la enfermedad incrementando las complicaciones que incluyen: cardiopatías, retinopatías, nefropatías y amputaciones (Terechenko et al., 2015).

La medicina tradicional tiene una función alternativa en el tratamiento de la DT2, siendo esta en muchas ocasiones la primer opción a la que recurren los pacientes, o bien empleando a las plantas como terapia combinatoria en el control de este padecimiento. Por otro lado las plantas también representan una buena alternativa para la búsqueda y desarrollo de nuevos antidiabéticos orales (Hernandez-Galicia et al., 2002).

Dentro de las plantas empleadas para tratar la DT2 se encuentran *Achillea millefolium* y *Plantago australis*, las cuales tienen pocos o nulos reportes científicos que demuestren la actividad antidiabética atribuida y su seguridad en el uso tradicional. Este hecho nos permitió seleccionarlas dichas plantas para su estudio químico, farmacológico y toxicológico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes mellitus

La diabetes es una enfermedad crónica no transmisible, progresiva de carácter metabólico y caracterizada por presentar hiperglucemia, con disturbios en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas (Guías ALAD, 2006). Adicionalmente, dependiendo del tipo de diabetes, suele estar acompañada por inadecuada secreción de insulina, resistencia de los tejidos a la acción de esta o bien una combinación de ambas; además de presentar una progresión gradual de estas alteraciones, teniendo como consecuencia la completa pérdida de la secreción de insulina y/o actividad de las células β pancreáticas (Chaudhury et al., 2017).

En su etapa inicial la diabetes no produce síntomas, por lo cual se detecta tardíamente esto así como, un tratamiento inadecuado ocasionan complicaciones de salud graves tales como neuropatías, cardiopatías, retinopatías, nefropatías, amputación de las extremidades inferiores y otras afecciones que limitan la calidad de vida o significan incapacidad para quienes la viven, y también puede causar muerte prematura. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Hernández-Ávila et al., 2013; OMS, 2016).

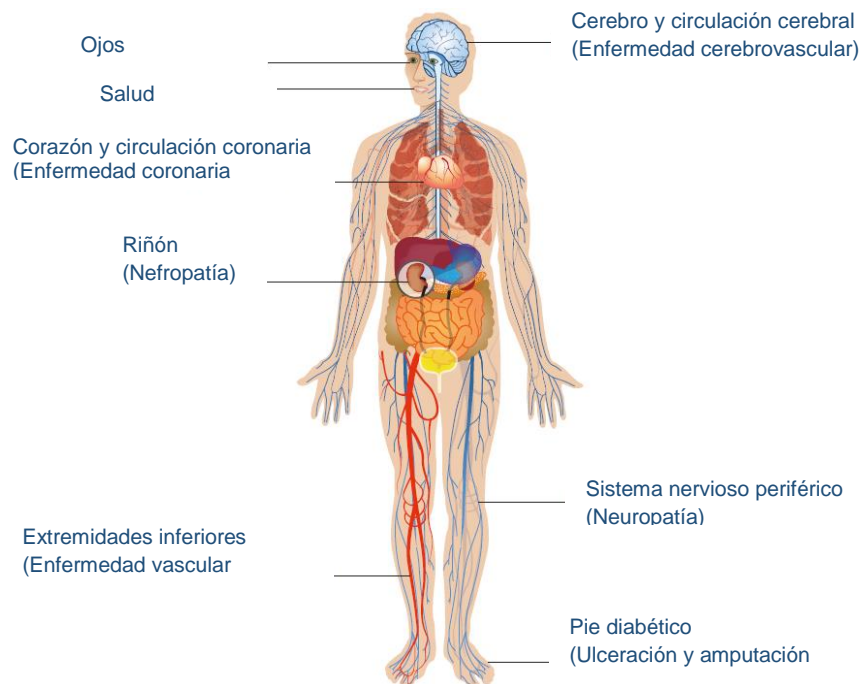


Figura 1. Principales complicaciones de la diabetes.

La clasificación y diagnóstico de la diabetes es complejo y ha sido sujeto de debate por décadas. Actualmente, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018) y con la Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2017), la diabetes se clasifica en tres tipos (Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2 y Diabetes Gestacional); sin embargo, de acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, 2018 (ADA, por sus siglas en inglés) contempla cuatro grupos que se describen a continuación (Figura 2):



Figura 2. Clasificación de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes (ADA).

- Diabetes tipo 1 (DT1): caracterizada por deficiencia absoluta de insulina. Sus principales manifestaciones se presentan en la pubertad, cuando ya la función se ha perdido completamente y la insulino terapia es necesaria como consecuencia de la destrucción de las células β que, generalmente, se da por procesos inmunes; sin embargo, existen casos donde esa destrucción es de origen idiopático.
- Diabetes tipo 2 (DT2): se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina, pero se requiere también que exista deficiencia en la producción de insulina, que puede o no ser predominante. Este tipo de diabetes se presenta principalmente en adultos; sin embargo, su frecuencia está aumentando en niños y adolescentes obesos.
- Diabetes gestacional (DG): esta se define como alteración del metabolismo de los carbohidratos de severidad variable, que se presenta por primera vez durante el embarazo.



- Otros tipos específicos de diabetes: son estados en donde la hiperglicemia puede ser causada por defectos genéticos, enfermedades pancreáticas, problemas endocrinos y/o exposición a agentes químicos o fármacos.

2.2. Epidemiología de la Diabetes

Las ECNT son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud. Lo son por varios factores: el gran número de casos, su creciente contribución a la mortalidad general, son una de las causas más frecuente de incapacidad prematura (Córdova-Villalobos, 2008).

Las ECNT son un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuyen a la mortalidad mediante un pequeño número de desenlaces, dentro de estas se encuentran diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedad respiratorias y cáncer (Córdova-Villalobos, 2008; FID, 2017).

En este contexto la diabetes ocupa un lugar importante en la ECNT, siendo adicionalmente un problema de salud pública. En 2017 se calculó que había 425 de millones de personas con diabetes y se estima que para 2045 esta cifra crecerá 48% dando un total de 629 millones (Figura 3). Por otro lado, este padecimiento se encuentra entre las 10 principales causas de muerte a nivel mundial y representa el 80% de las muertes prematuras por ECNT (Córdova-Villalobos, 2008; FID, 2017). Adicionalmente, se calcula que en todo el mundo existen 212.4 millones de personas, y que la mitad de estas no son conscientes de tener la enfermedad (FID, 2017).

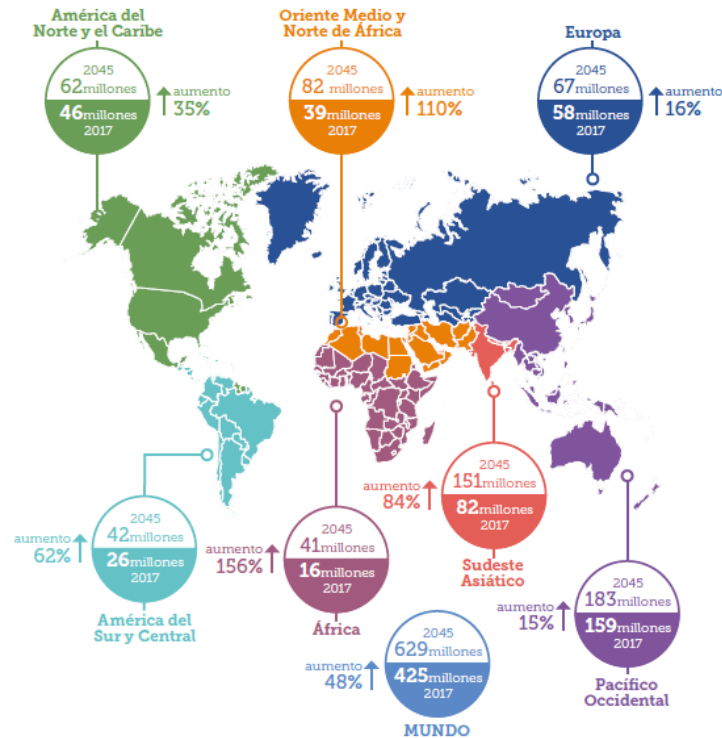


Figura 3. Número de personas con diabetes en el mundo y por región en 2017 y 2045 (20-79 años) (Tomado de: FID, 2017).

La diabetes y sus complicaciones generan grandes pérdidas económicas para los pacientes y sus familias, así como para los sistemas de salud y las economías nacionales, ya que reducen la productividad, frenan el crecimiento económico, genera gastos catastróficos en hogares vulnerables y sobrecarga los sistemas sanitarios (FID, 2017). En 2017 la FID calculó que el gasto sanitario total en diabetes alcanzó los 727,000 millones de USD (20 a 79 años), en la tabla 1 se presentan los 10 países con el mayor gasto sanitario a nivel mundial, donde México ocupa el lugar número 8.



Tabla 1. Los 10 países con mayor gasto sanitario total en diabetes en 2017 (20 a 79 años) (Tomada: FID, 2017).

Clasif.	País	Gasto sanitario total*
1	Estados Unidos	348
2	China	110
3	Alemania	42
4	India	31
5	Japón	28
6	Brasil	24
7	Federación Rusa	20
8	México	19
9	Francia	18
10	Canada	15

*Miles de millones ID

En 2017, las personas con diabetes en NAC han gastado 377,300 millones de USD en asistencia sanitaria. Esta cifra supera a la de cualquier otra región del mundo, lo que corresponde al 52% del total gastado a nivel mundial (FID, 2017).

El panorama en México no es menos desalentador ya que este padecimiento está creciendo de forma alarmante y, sin duda alguna, es el mayor reto que enfrenta el Sistema Nacional de Salud al ser una de las 10 principales causas de muerte (Tabla 2). Esta enfermedad también es la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas (entre 15% y 20%) (Soto-Estrada, 2016).



Tabla 2. Principales causas de muerte en México, 2013
(Tomado de: Soto-Estrada, 2016).

Orden	Principales causas	Defunciones	Porcentaje (%)
	Total	623,600	100.0
1	Enfermedades del corazón ^a	116,002	18.6
2	Enfermedades isquémicas del corazón	79,301	12.7
3	Diabetes mellitus	89,420	14.3
4	Tumores malignos	75,229	12.1
5	Accidentes	36,293	5.8
6	De tráfico en vehículos de motor	15,847	2.5
7	Enfermedades del hígado	34,765	5.6
8	Enfermedad alcohólica del hígado	12,760	2.0
9	Enfermedades cerebrovasculares	32,675	5.2
10	Agresiones	23,063	3.7
11	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	20,481	3.3
12	Influenza y neumonía	17,417	2.8
13	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal ^b	12,948	2.1
14	Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal	5,874	0.9
15	Insuficiencia renal	11,983	1.9
16	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosomáticas	9,375	1.5
17	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	8,303	1.3
18	Lesiones autoinfligidas intencionalmente	5,909	0.9
19	Bronquitis crónica y no especificada, enfisema y asma	5,470	0.9
20	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana	4,997	0.8
	Las demás causas	119,270	19.1

^aSe excluye paro cardíaco. ^bIncluye tétanos neonatal.

Fuente: INEGI. Estadísticas de mortalidad.

De acuerdo a la ficha del Perfil de los Países que integra OMS, en México se contabilizaron 89,420 muertes por diabetes, de las cuales 53% corresponden a mujeres y 47% a hombres (OMS, 2016).

2.3. Insulina: síntesis, secreción y señalización.

La insulina es una hormona secretada por el páncreas (~6,000 kDa) está formada por 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A (21 aminoácidos (aa)) y la cadena B (30 aa) las cuales se mantienen unidas por 2 puentes disulfuro intermoleculares entre el aminoácido 7 de cada una de las cadenas y el 20 de la cadena A con el 19 de la cadena B y un enlace intramolecular en la cadena A, entre los aminoácidos 6 y 11 (Morimoto-Martínez, 2000).



La insulina es sintetizada en las células β de los islotes pancreáticos como una sola cadena llamada preproinsulina (109 aa; 11,500 kDa), la cual se empaqueta en microvesículas en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, experimenta algunas modificaciones estructurales que dan lugar al plegamiento de la cadena y formación de los puentes disulfuro, generando a la proinsulina (83 aa; 9,000 kDa) la cual es transportada al aparato de Golgi, donde se almacena en gránulos de secreción. Posteriormente, la proinsulina es hidrolizada por enzimas proteolíticas que dan lugar a la insulina y al péptido C (32 aa), ambos liberados por exocitosis en cantidades equimolares (Figura 4) (Morimoto-Martínez, 2000).

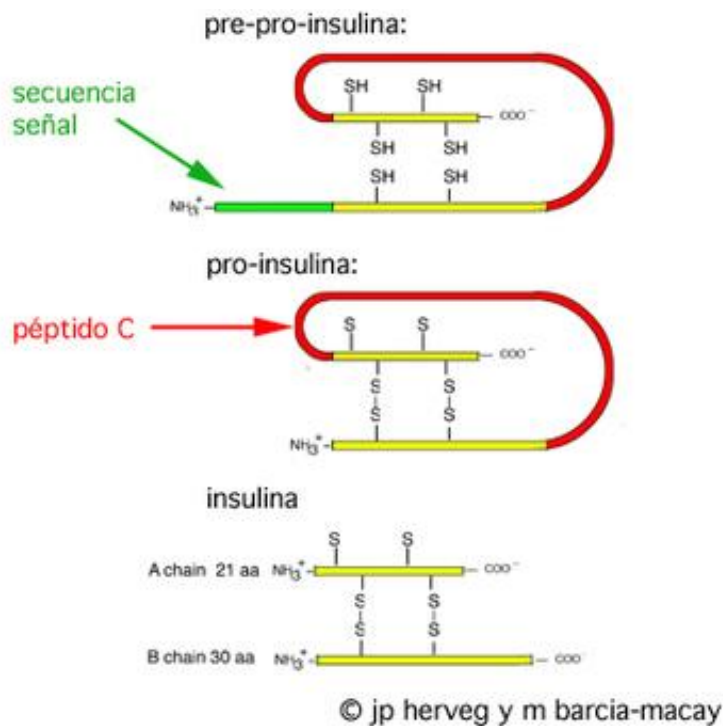


Figura 4. Síntesis de insulina
(Tomado de: <http://bioquimicaenelhospital13.wikifoundry.com>).

La insulina es liberada en respuesta a la alta concentración de nutrientes en sangre (glucosa; algunos aminoácidos: leucina, alanina y glutamina; ácidos grasos libres) y algunos otros factores (neurotransmisores y hormonas: melatonina, estrógenos, leptina, hormonas de crecimiento y péptido similar a glucagón tipo 1 (GLP-1); sin embargo, entre los diversos elementos capaces de estimular la secreción de insulina, la glucosa es fisiológicamente el más importante. Tras la liberación de insulina esta se une a su receptor, lo cual desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones

biológicas (Morimoto-Martínez, 2000; Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008; Fu et al., 2013).

Dentro de las acciones de la insulina, la más importante es mantener la homeostasis de la glucemia (70-110 mg/dL), favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo y tejido adiposo, y en hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción. Además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Por otro lado, promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (figura 5) (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

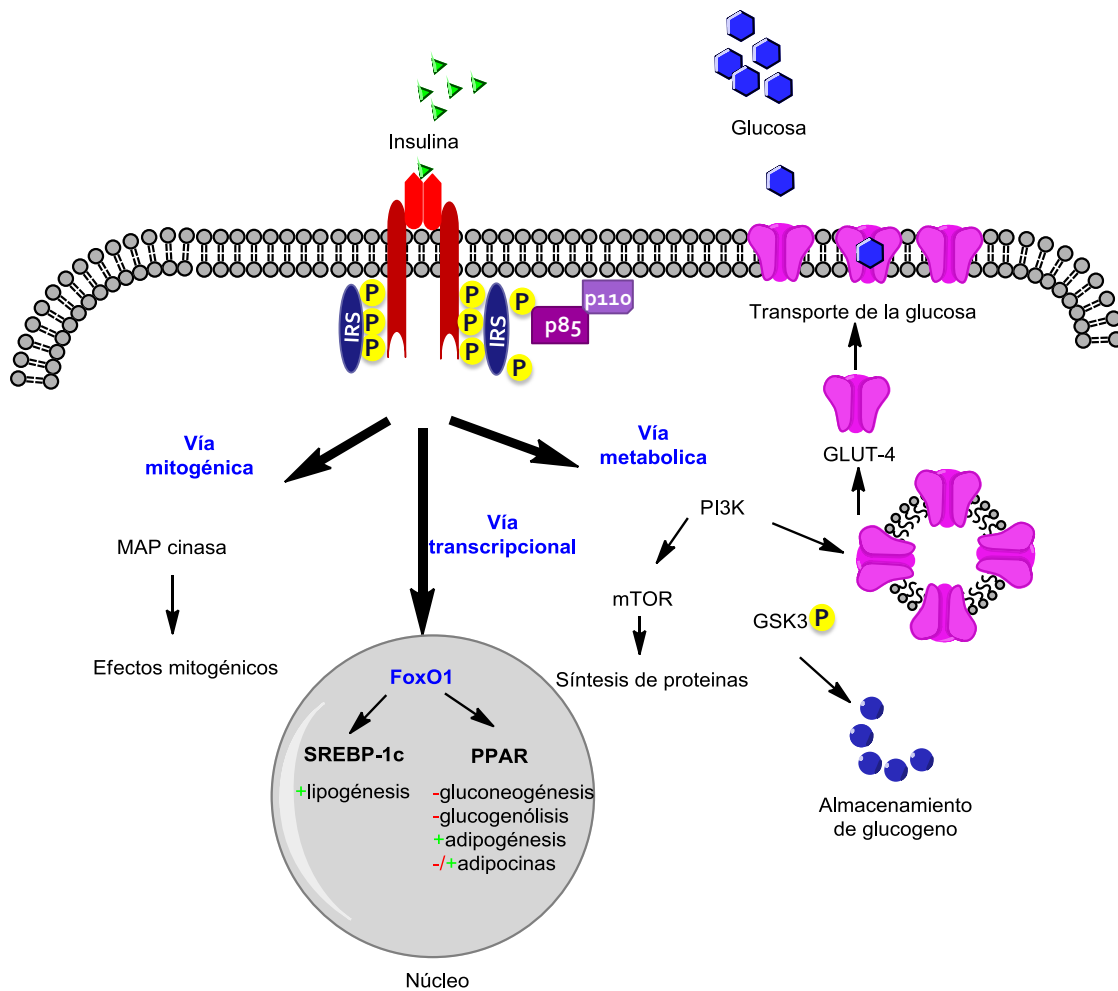


Figura 5. Señalización de la insulina: principales efectos biológicos.

Tras la ingesta de alimentos la glucemia se incrementa, favoreciendo su entrada a las células β a través de transportador de glucosa de baja afinidad, GLUT-2 (Kellett et al., 2008). Una vez dentro de las células se da inicio al metabolismo de glucosa (glucólisis,



ciclo de Krebs), dando como resultado producción e incremento de ATP. Este incremento provocará el bloqueo de los canales de K^+ sensibles a ATP, generando la despolarización de membrana y consecuente apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje. La movilización e incremento de Ca^{2+} intracelular activará el sistema de polimerización de microtúbulos, ocasionando que la proinsulina empaquetada en los gránulos secretores llegue a la membrana y por exocitosis liberen finalmente insulina al medio extracelular (Figura 6) (Roche, 2003; Ornelas-Mendoza, 2018).

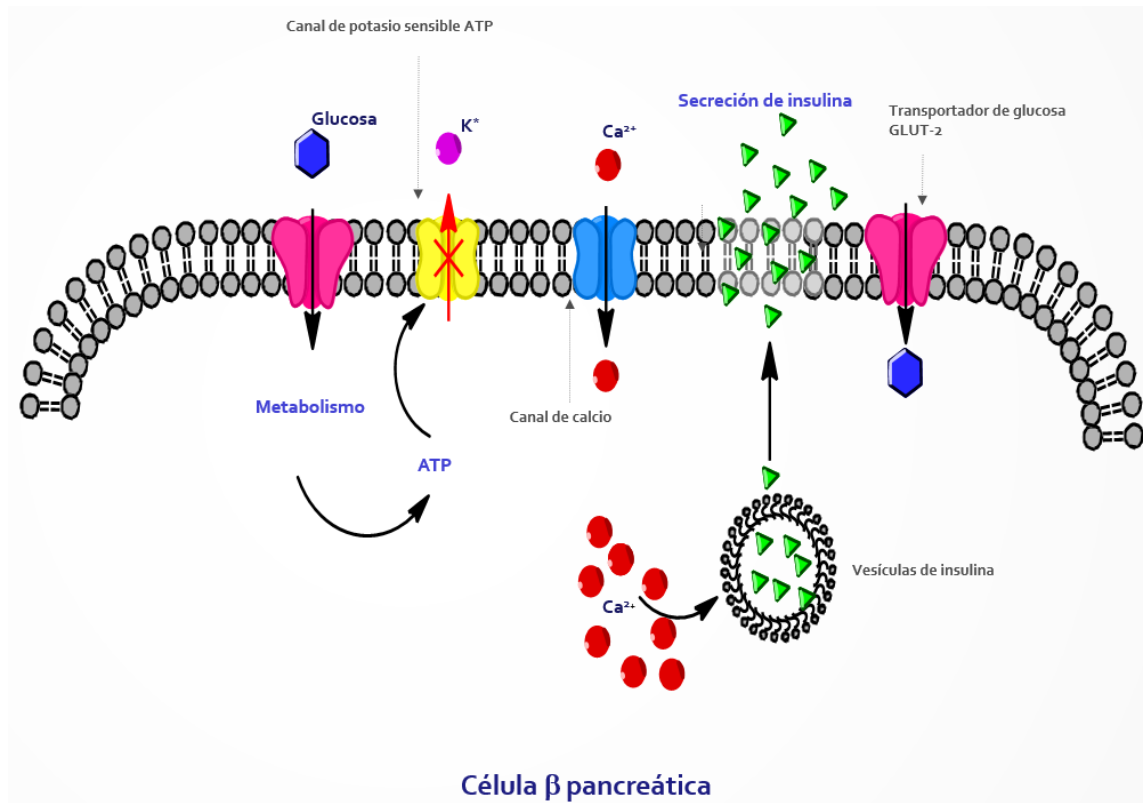


Figura 6. Secreción de la insulina de las células β pancreáticas.

Una vez que la insulina es liberada ejerce sus múltiples acciones siendo una de las más importantes la señalización en músculo esquelético, músculo cardiaco y tejido adiposo. Esos tejidos expresan transportadores de glucosa de alta afinidad (GLUT-4) los cuales son estimulados por acción de la insulina para incorporarse a la membrana plasmática incrementando de 10 a 20 veces el transporte de glucosa (Castrejon et al., 2007). Para ejercer sus la insulina se une a su receptor (RI), lo que conlleva a un cambio conformacional que promueve la actividad tirosinacinas del receptor.



El RI es una glucoproteína de la familia de receptores de crecimiento con actividad tirosinacinasasa intrínseca, los cuales tras ser estimulados por su ligando se autofosforilan en residuos de tirosina (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

El RI es un heterotetrámero conformado por dos subunidades α y dos subunidades β , las cuales se conectan mediante puentes disulfuro. En condiciones de no estímulo las subunidades α ejercen un papel regulador sobre las subunidades β inhibiendo su capacidad de autofosforilación. Las subunidades α son extracelulares y son el sitio de unión a la insulina. Las subunidades β están conformadas por una porción extracelular, una transmembranal y una porción intracelular en la cual se localiza el dominio con actividad de tirosinacinasasa. La región intracelular está conformada por tres regiones estructurales: 1) región yuxtamembranal, importante en la transmisión de la señal (Tyr⁹⁶⁵ y Tyr⁹⁷²), 2) región reguladora (Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶² y Tyr¹¹⁶³). La autofosforilación de estos tres residuos aumenta de 10 a 20 veces la actividad tirosinacinasasa del receptor, y 3) región con sitios de fosforilación en el extremo carboxilo terminal (Tyr¹³²⁸, Tyr¹³³⁴) que, al parecer, tienen una función importante en la regulación del receptor (Figura 7). Actualmente, se sabe que se necesita al menos de 7 sitios de fosforilación de tirosina en el RI para el adecuado funcionamiento del receptor (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

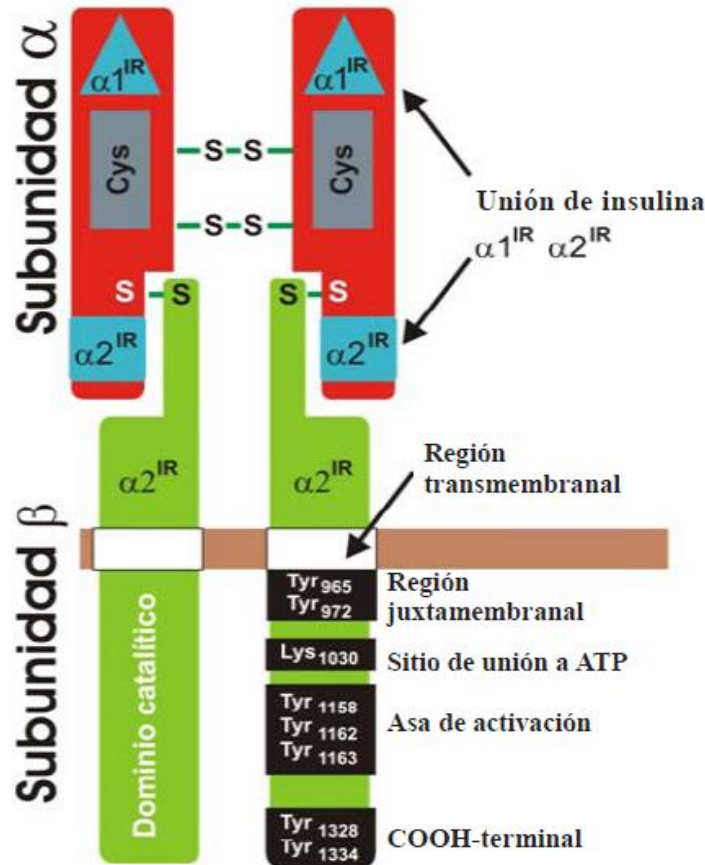


Figura 7. Estructura del receptor de insulina (RI). Tomado de: Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008.

En personas sanas, la unión de la insulina con su receptor enciende la cascada de señalización que conlleva a la activación de dos vías de transducción principales: vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas) responsable de la expresión génica y efectos mitogénicos de la insulina; y la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) responsable de la regulación energética de la glucosa (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

La vía de PI3K es responsable de muchos eventos celulares, siendo el más importante la regulación del metabolismo de glucosa. Esta vía se activa una vez que la insulina se une con su receptor RI, lo cual conlleva a cambios conformacionales que propician la autofosforilación del mismo en residuos de tirosina, así como también del sustrato receptor de insulina tipo 1 (SRI-1), el cual contiene varios sitios de fosforilación que se convierten en sitios de unión y activación de proteínas que tienen dominios SH2 y PI3K. La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110).

La interacción entre p85/IRS-1 promueve la activación de p110. De esta forma la PI3K activada fosforila al fosfatidilinositol 3,4 bisfosfato (PIP₂) generando al fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato (PIP₃), el cual, corriente abajo, conduce a la activación de la proteína Akt desencadenando la traslocación de GLUT-4 a la membrana, lo que permitirá la entrada de glucosa en las células de los tejidos músculo, adiposo, corazón e hígado (Figura 8).

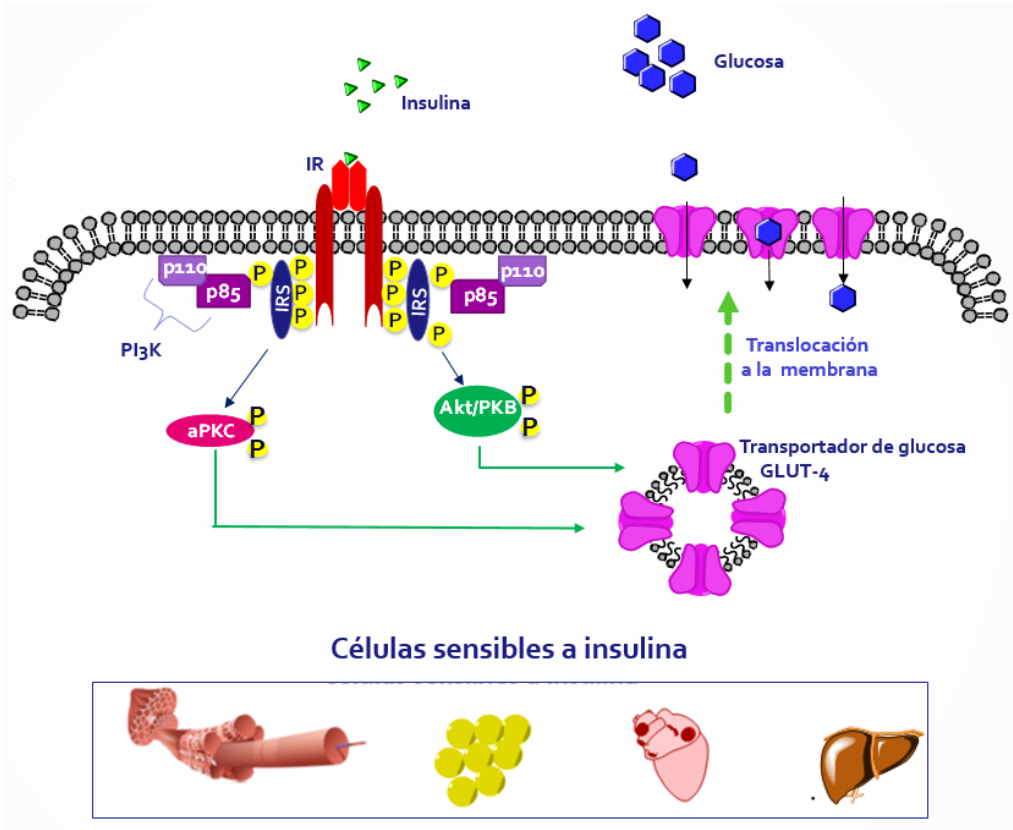


Figura 8. Señalización de la insulina.

2.4. Patogénesis de la diabetes tipo 2

La DT2 es el resultado de la resistencia crónica a la insulina (RCI) y la pérdida de la función y masa de la células β pancreáticas. Además, están implicados en el desarrollo de esta enfermedad factores genéticos y ambientales (alimentación y estilo de vida) (Figura 9). La obesidad es el principal factor asociado al desarrollo de resistencia a la insulina, que se puede considerar el preludio de la DT2 (Fu et al. 2013).

La resistencia a la insulina es un estado patológico donde las células sensibles a la insulina dejan de responder a esta, debido presumiblemente a defectos en su señalización. De esta forma la RCI progresará a DT2 una vez que las células β no puedan secretar la cantidad necesaria de insulina para ejercer su acción y compensar la



disminución de la sensibilidad a la insulina (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008; Fu et al., 2013).

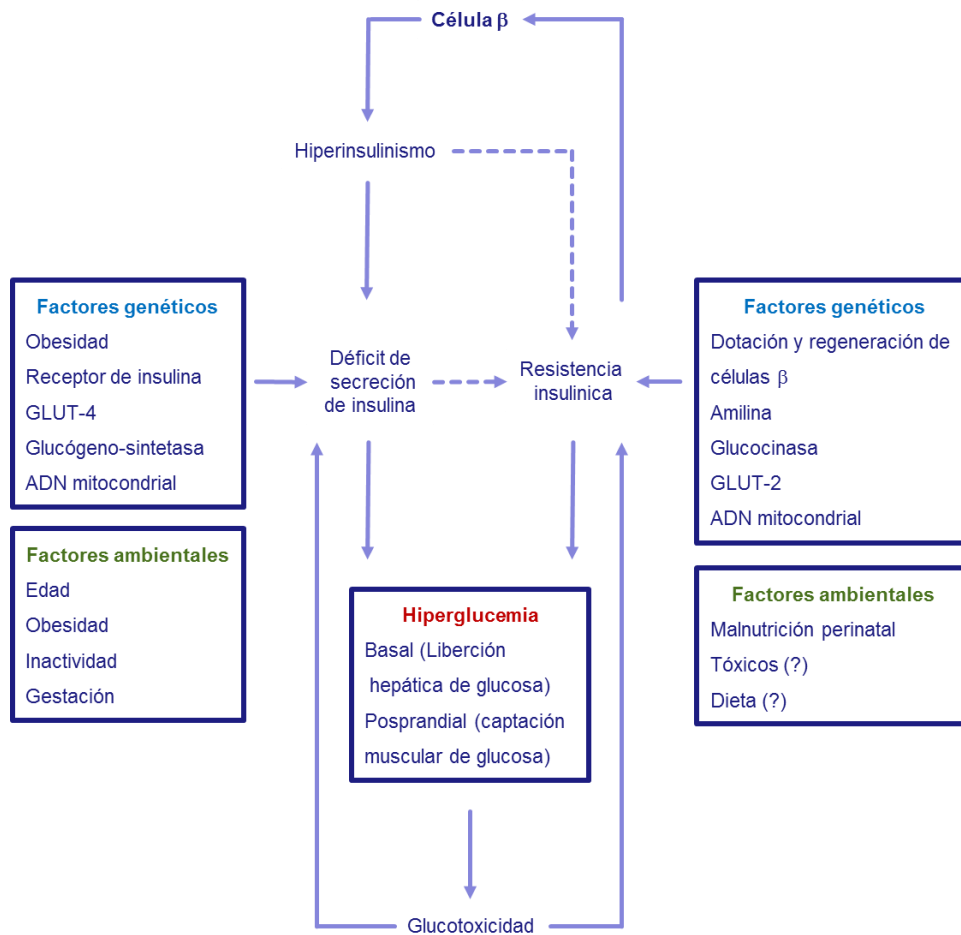


Figura 9. Factores involucrados en el desarrollo de la DT2 (Modificado de: Morlett-Chávez et al., consultado 2018).

En la primera etapa de la resistencia a la insulina los sujetos experimentan un estado de hiperinsulinemia, resultado de la secreción excesiva de insulina por las células β con el fin de mantener en homeostasis la glucemia (normoglucemia). Sin embargo, con el paso del tiempo las células β se agotan y hay disfunción asociada con la pérdida de células, lo que conllevará a un estado de hipoinsulinemia e hiperglucemia y posterior establecimiento de la DT2 (Figura 9) (Guillausseau et al., 2008; Fu et al., 2013).

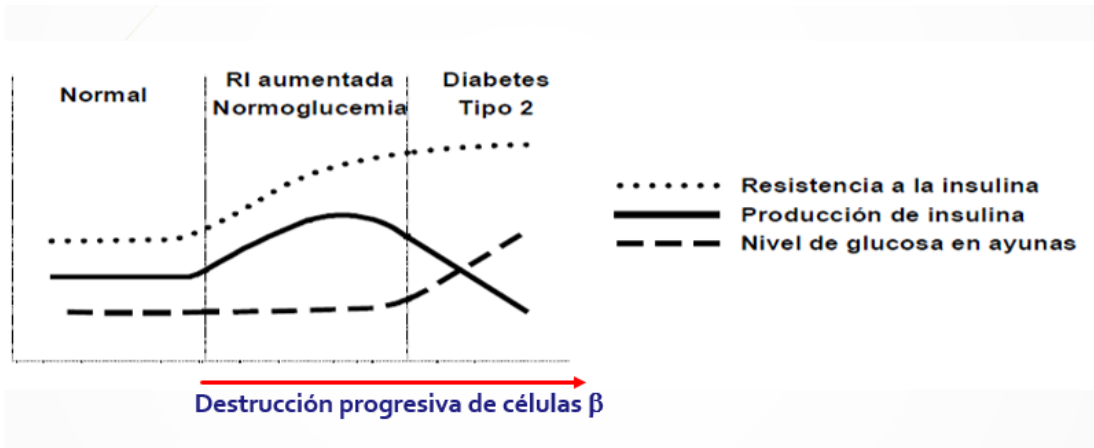


Figura 10. Establecimiento de la diabetes cambios en los niveles de insulina y glucosa.

Un estudio prospectivo de la diabetes en el Reino Unido reveló que la capacidad insulinosecretora de las células β está disminuida hasta 50% cuando a los sujetos se les diagnostica diabetes y que disminuye 15% seis años posteriores al diagnóstico (Figura 11) (Guillausseau et al., 2008). Adicionalmente, en los sujetos con DT2 se incrementa la apoptosis y se reduce la masa de células β . A medida que el número de células β disminuye el espacio que ocupaban acumula proteína amiloide; sin embargo, su función en la patología no está bien descrita (Fu et al., 2013).

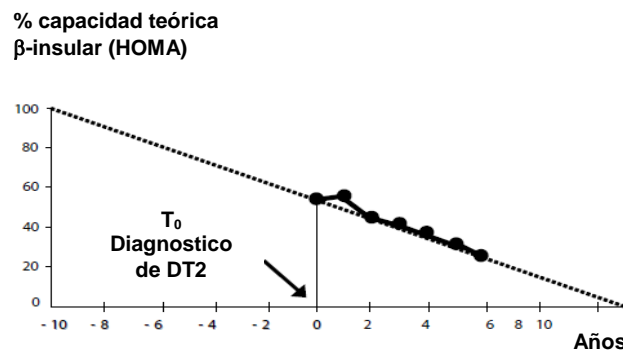


Figura 11. Progresión de la insulino deficiencia en diabetes tipo 2 (DT2) (Guillausseau et al., 2008).

Otros factores involucrados con la disfunción de las células β y que también participan en las complicaciones microvasculares (retinopatías, nefropatías, neuropatías) y macrovasculares (enfermedad cerebrovascular, enfermedad cardiovascular, pie diabético), son la exposición prolongada a la hiperglucemia (Glucotoxicidad) y a los ácidos grasos libres (Lipotoxicidad), procesos que en conjunto se conocen como “Glucolipotoxicidad” (Fu et al., 2013). A su vez, este proceso es el principal involucrado en



el desarrollo de la resistencia a la insulina, ya que genera moléculas que participarán directamente en la inadecuada señalización de la insulina y por ende se disminuya el transporte y utilización de la glucosa.

Como se mencionó, la obesidad es el principal factor relacionado con el desarrollo de la RCI (Figura 12), donde el tejido adiposo tiene una función central. De manera general, el tejido adiposo almacena energía en forma de triglicéridos; sin embargo, su función como tejido endocrino es la secreción de adipocinas que mediarán distintas respuestas biológicas como regulación del balance energético, respuestas inmune, endocrina y vascular (Vieira-Potter, 2014).

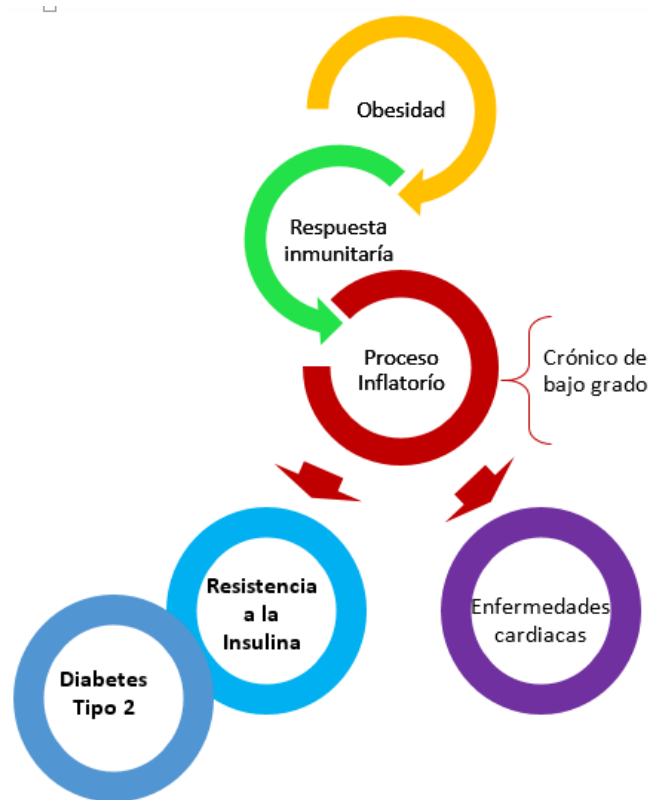


Figura 12. Relación entre la obesidad y desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardíacas (Modificado de: Blancas-Flores et al., 2010).

El tejido adiposo está compuesto en un 50% de adipocitos y 50% por células del estroma vascular, que incluye preadipocitos, fibroblastos, células inmunes, células endoteliales, células musculares (Figura 13) (Vieira-Potter, 2014).

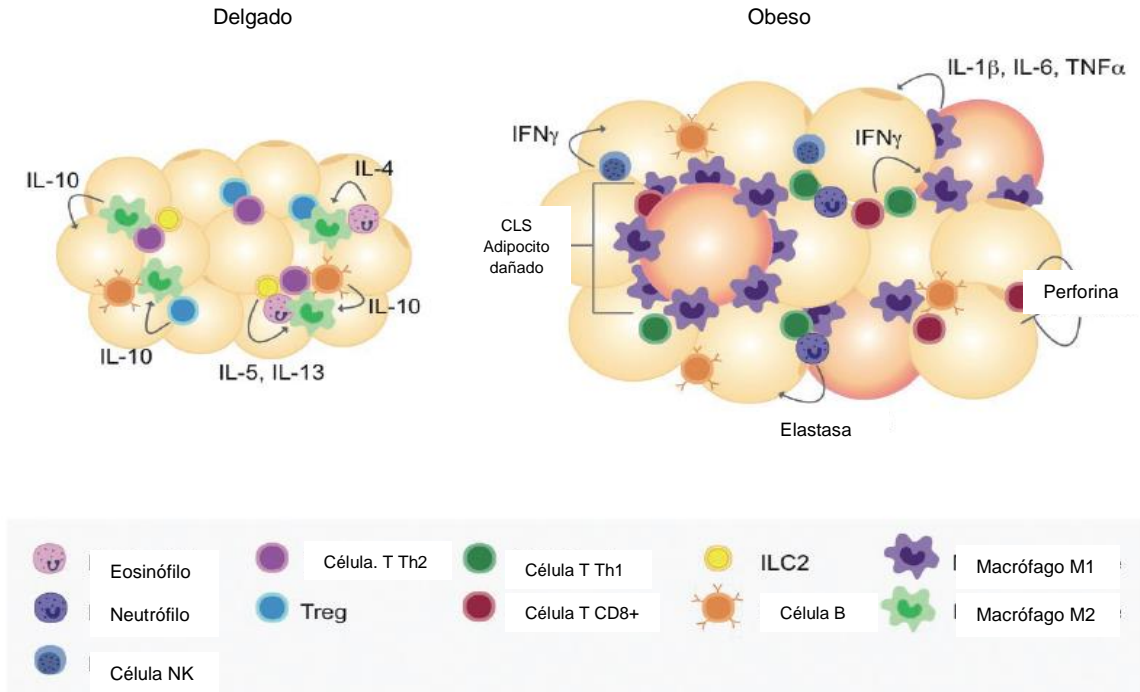


Figura 13. Composición del tejido adiposo de personas delgadas y obesas (Modificado de: Ghazarian et al., 2015).

Cuando los adipocitos han alcanzado 8 veces su tamaño pierden la capacidad de almacenar ácidos grasos y estos migran a tejidos donde anteriormente no se encontraban, como el músculo (Castillo-Barcías, consultado 2018). Por otro lado, en sujetos obesos los adipocitos experimentan un incremento tanto en número (hiperplasia) como en tamaño (hipertrofia), lo cual contribuye a que los adipocitos experimenten hipoxia y muerte, esto conlleva a estrés oxidativo, formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), secreción de adipocinas y liberación de ácidos grasos que se encontraban dentro del adipocito, e incrementando la cantidad de ácidos grasos libres (AGL) (Ghazarian et al., 2015) (Figura 14).

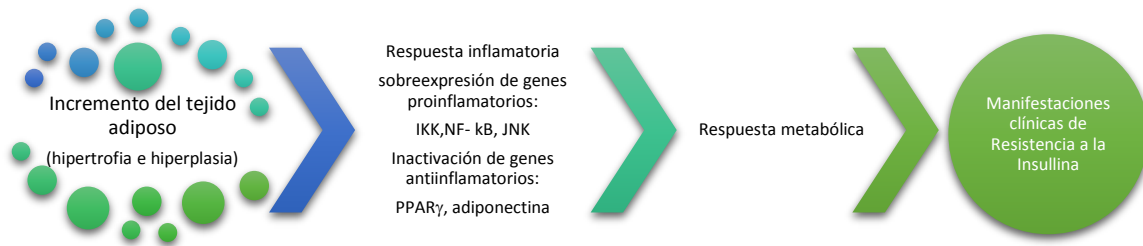


Figura 14. Asociación de obesidad con la inflamación crónica de bajo grado y desarrollo de la RI (Modificado de: Blancas-Flores et al., 2010).

El incremento de AGL y TNF- α promueven la formación de diacilglicerol (DAG) y, la activación de la proteína cinasa C (PKC) que fosforilara al IRS en residuos de serina en lugar de tirosina, dando una inadecuada señalización de la insulina y baja o nula translocación del GLUT-4 a la membrana, esto promoverá el desarrollo de RCI (Acosta-García, 2012; Kwon y Pessin, 2013). Por otro lado, los AGL modulan la expresión de genes implicados en diversas rutas lipolíticas como los que codifican la carnitil palmitoil transferasa tipo 1 (CPT-1), la acil-CoA oxidasa (ACO) peroxisomal, proteína desacopladora 2 (UCP-2) mitocondrial. Los ácidos grasos también disminuyen la expresión génica de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la enzima clave de la ruta lipogénica y que sintetiza malonil-CoA, el inhibidor fisiológico de la CPT-1 (Roche, 2003). En este sentido los AGL participarán en la regulación de acetil CoA. En el páncreas, el exceso de acetil CoA de cadena larga es tóxico para las células β , lo cual, asociado a la generación del anión superóxido conduce a la apoptosis celular y el fallo gradual en la liberación de insulina. Además, la generación en exceso de acil CoA o de sus derivados, como la ceramida, pueden reducir la activación de la cinasa de treonina Akt1, intermediaria en la vía de señalización de la insulina por medio de la PI3K (Acosta-García, 2012).

Los AGL, la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y las EROs activan al factor de nuclear *kappa* B (NF- κ B). Este es un factor de transcripción inducible que participa en la respuesta inmune y en la respuesta inflamatoria, activando un gran número de citocinas proinflamatorias (TNF- α) y suprimiendo otras, como adiponectina y también GLUT-4, por lo cual su activación se relaciona con el establecimiento de la RCI (Acosta-García, 2012; Blancas-Flores et al., 2010).

Durante la obesidad, además de AGL, se producen y secretan distintas adipocinas, que son protagonistas del proceso conocido como inflamación crónica de bajo grado. Entre las adipocinas secretadas están: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), resistina, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), leptina, fibrinógeno y componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Sin embargo, el TNF- α y la IL-6 tienen una función importante en la RCI (Figura 15) (Acosta-García, 2012).

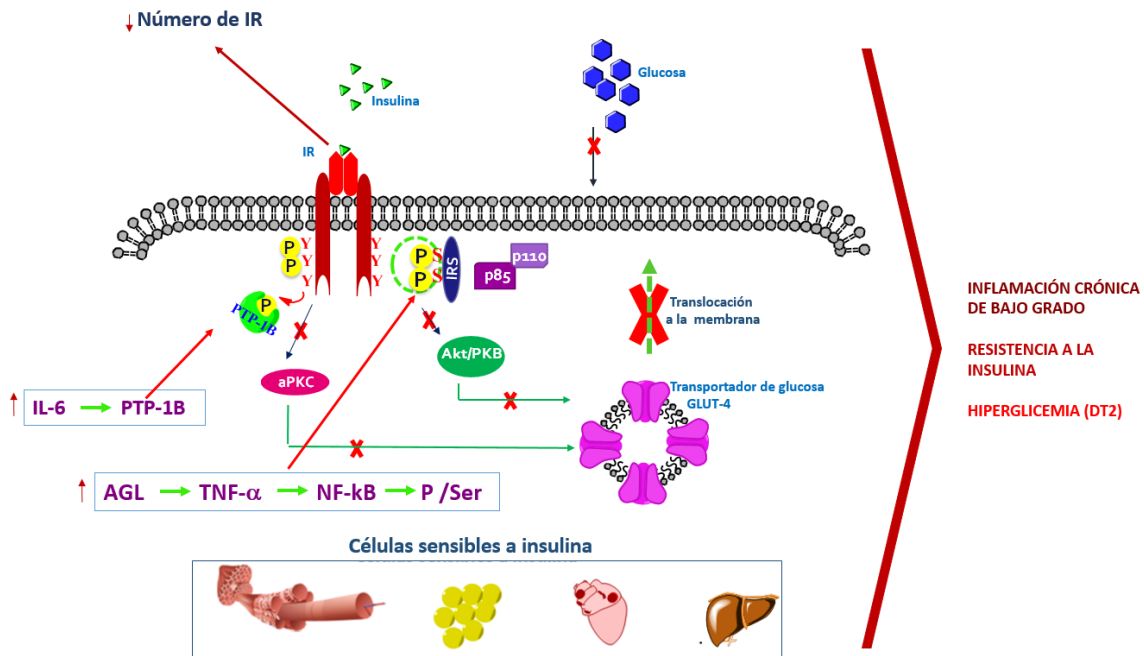


Figura 15. Principales mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la resistencia a la insulina.

TNF- α fue la primera citocina descubierta en ser secretada por el tejido adiposo, además también es secretada por los macrófagos. El RNA mensajero del TNF- α , y su consecuente síntesis en el tejido adiposo, se ha relacionado de manera directamente proporcional al IMC, así como con la resistencia a la insulina (Gutiérrez-Ruiz et al., 2011). El TNF- α tiene una función importante en la fisiopatología de la RCI, ya que la unión a sus receptores (p55 y p75) activa las cinasas de la familia IKK, que fosforilan al inhibidor del factor nuclear- κ B (I κ B), activando al factor nuclear- κ B (NF- κ B), lo cual favorece la fosforilación del IRS-1 en el residuo de serina y esto evita su interacción con la sub-unidad β del RI frenando la señalización de la insulina y translocación de GLUT-4. Por otro lado, TNF- α estimula la expresión de 142 genes y disminuye la expresión de 72 a través del NF- κ B. Entre los genes estimulados se encuentran los del propio NF- κ B, citocinas y



factores de crecimiento, lipasa sensible a hormona, enzimas y moléculas de señalización; mientras que entre los inhibidos están GLUT-4, acil CoA sintetasa de cadena larga, adiponectina, receptor de ácido 9-cis retinoico (RXR) y receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), de esta forma también contribuye con el establecimiento de la RCI (Acosta-García, 2012; Kwon y Pessin, 2013).

Esta citocina es secretada por una gran cantidad de células, dentro de las que destacan: macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, e incluso el músculo esquelético, y su producción correlaciona con la adiposidad y es estimulada principalmente por el TNF- α y las catecolaminas.

IL-6 disminuye la señalización de insulina, inhibe la adipogénesis y estimula la lipólisis, aumenta la circulación de AGL y disminuye la secreción de adiponectina. Por otro lado, interrumpe la señalización de la insulina incrementando la expresión del supresor 3 de señalización de citoquinas (SOCS3) que es un regulador negativo de la señalización de leptina e insulina y que interfiere con la señal de traducción de la citocina y con la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y del IRS-1, promoviendo la degradación proteosomal del IRS-1, lo que reduce la activación de la Proteína Cinasa B (PKB) y por ende la translocación del GLUT-4 a la membrana plasmática (Acosta-García, 2012; Kwon y Pessin, 2013).

IL-6 también activa a la enzima proteína tirosina fosfatasa 1-B (PTP-1B), regulador negativo en la señalización de la insulina y leptina por inactivación del RI al desfosforilar residuos de fosfotirosina en las subunidades β del receptor y del IRS. De esta forma la señalización de la insulina se encuentra activa menos tiempo y resultando en una menor e ineficiente translocación de GLUT-4 a la membrana (Kwon y Pessin, 2013).



2.5. Diagnóstico de diabetes tipo 2

De acuerdo a los estándares de atención médica en diabetes publicados por la ADA 2018, los nuevos criterios de diagnóstico para la DT2 pueden darse por (Figura 16):

- Síntomas de Diabetes (poliuria, polidipsia, pérdida de peso sin otra causa) aunado a esto glucemia plasmática casual (es decir, cualquier hora del día sin importar la hora de la última comida) ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L).
- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L).
- Glucemia plasmática a las 2 horas de la prueba de tolerancia a la glucosa (PTOG) o potsprandial ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L).
- Hemoglobina glicosilada (HbA1C) $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol).

Sin embargo, para confirmar el diagnóstico se sugiere presentar al menos un resultado adicional de glucemia plasmática igual o mayor a los valores establecidos.

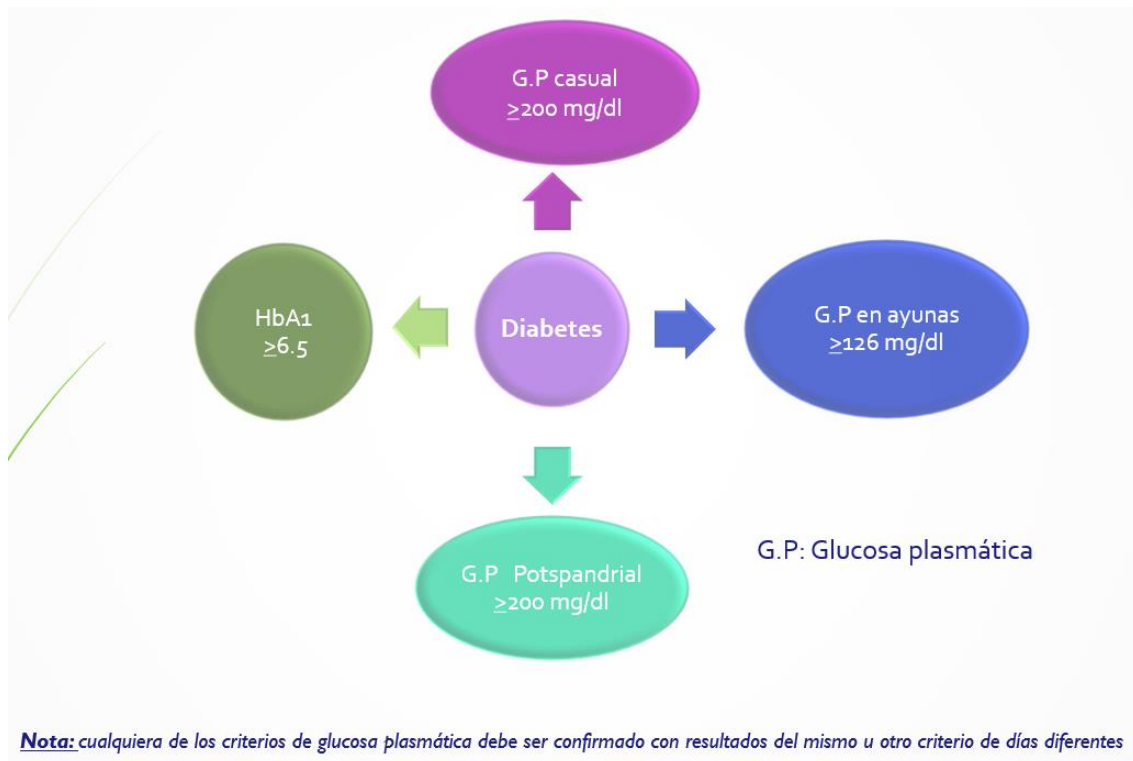


Figura 16. Criterios de diagnóstico de la diabetes tipo 2.



Por otro lado, de acuerdo a la ADA y a la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos se recomienda un estudio exploratorio para descartar prediabetes, a partir de los 45 años en individuos con riesgo de obesidad ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$), hipertensión e historial familiar. Los criterios de diagnóstico para prediabetes son (ADA, 2018; Chaudhury et al., 2017):

- Glucemia en ayuno de 100-125 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)
- Glucemia postprandial de 140-199 mg/dL (7.9-11.0 mmol/L)
- HbA1C de 5.7-6.4%. Pacientes que presenten niveles de HbA1C $>6\%$ se consideran con alto riesgo de desarrollar diabetes.

Los pacientes diagnosticados con prediabetes pueden realizarse estudios cada año. Es importante destacar que el 70% de los diagnosticados con prediabetes que no llevaron adecuado apego al tratamiento, así como en su estilo de vida (alimentación y ejercicio) desarrollaran la enfermedad al cabo de 10 años o menos (Chaudhury et al., 2017).

Tras haberse realizado el diagnóstico de DT2 los pacientes tienen que adherirse tanto al tratamiento no farmacológico que comprende cambiar el estilo de vida, es decir, adopción de alimentación saludable, aumento de actividad física, mantener peso corporal adecuado y eliminar malos hábitos como fumar, así como al tratamiento farmacológico, donde el fármaco de primera elección en el mundo es la metformina (IDF, 2017). Siendo el objetivo principal de ambos tratamientos el adecuado control glucémico, ya que este será el parte aguas de la prevención, retraso y progresión de las complicaciones diabéticas (Chaudhury et al., 2017).



2.6. Tratamiento de la Diabetes tipo 2

Actualmente se cuenta con fármacos que actúan a distintos niveles (Figura 17), teniendo como principal efecto farmacológico el control o reducción de la glucemia, con lo que se trata de garantizar la reducción de síntomas cardinales, mejorar la calidad de vida y prevenir complicaciones agudas y crónicas, y disminuir la mortalidad (ALAD, 2013; Mateos-Santa Cruz et al., 2002). La selección del fármaco para cada caso debería estar enfocado en las características y necesidades del paciente, considerando la eficacia, costo, efectos secundarios, peso y comorbilidades (Chaudhury et al., 2017); siendo los fármacos más empleados para tratar este padecimiento las biguanidas (metformina), sulfonilureas (glibenclamida) y tiazolidinedionas (pioglitazona).

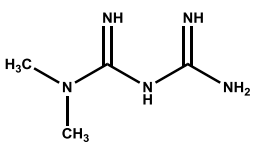
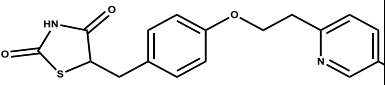
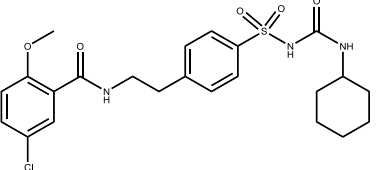


Figura 17. Grupos de antidiabéticos orales de acuerdo a su efecto farmacológico.

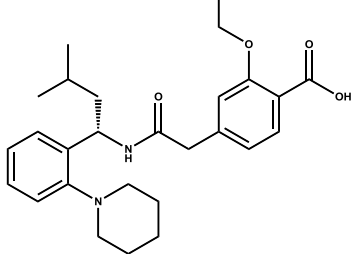
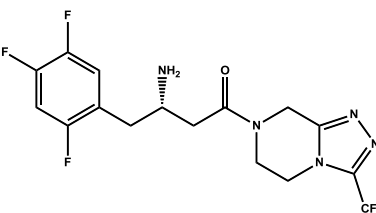
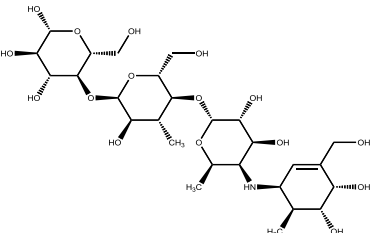
Sin embargo, en algunos casos, dada la no adherencia de los pacientes al tratamiento (no farmacológico y farmacológico) y/o bien a la progresión de la enfermedad, es necesario recurrir a terapias donde se combinan dos o más de los fármacos antidiabéticos disponibles actualmente (Tabla 3). Cuando los medicamentos antidiabéticos orales no controlan la hiperglicemia, se suele recurrir a la insulina (IDF, 2017).



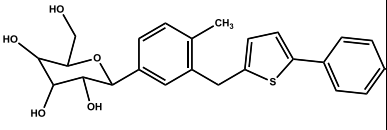
Tabla 3. Principales grupos de fármacos empleados en el tratamiento de diabetes
(Modificado de ADA, 2018; Chaudhury et al., 2017).

Grupo	Ejemplo	Mecanismo de acción	Contraindicaciones
Biguanidas	 Metformina	Activación de la Enzima Activada por AMP (AMPK) Efecto biológico: Tiene su mayor efecto en hígado donde inhibe la gluconeogénesis, también tiene un importante efecto sensibilizador de la insulina a nivel periférico.	Está contraindicada en insuficiencia renal o hepática y en alcoholismo, porque se puede producir acidosis láctica. Puede producir deficiencia de la vitamina B12.
Tiazolidinedi-onas	 Pioglitazona	Activación de PPARγ Efecto biológico: Su principal efecto es sensibilizador de la insulina. Favorece la expresión y translocación del GLUT-4, y otros genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos.	Está contraindicado en insuficiencia cardíaca severa. Retención de líquidos y riesgo de fracturas.
Sulfonilureas	 Glibenclamida	Bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP Efecto biológico: Secretagogo de insulina. Las sulfonilureas de última generación, como glimepirida, tienen efectos favorables sobre el sistema cardiovascular, la función endotelial y la célula β .	La glibenclamida está contraindicada en falla renal. Su principal reacción adversa es hipoglicemia. Puede favorecer la ganancia de peso.



<p>Meglitidinas</p>	 <p>Repaglinida</p>	<p>Bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP</p> <p>Efecto biológico: Secretagogos de insulina de acción corta.</p>	<p>Por su metabolismo hepático, se debe evitar en falla severa de éste órgano. Además, la nateglinida se debe evitar en falla renal severa.</p>
<p>Inhibidores de dipeptidil-peptidasa 4 (DPP-4)</p>	 <p>Sitagliptina</p>	<p>Inhibición de las enzimas Dipeptidopeptidasas 4</p> <p>Efecto biológico: Al inhibir a las DPP-4 no se degrada Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), lo que promueve la secreción de insulina. *Insulinosecretagogo dependiente de glucosa</p>	<p>Riesgo de pancreatitis.</p>
<p>Agonistas de GLP-1</p>	<p>H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂</p> <p>Exenatida</p>	<p>Activación del receptor de GLP-1</p> <p>Efecto biológico: Activa el receptor de GLP-1 y se estimula la secreción de insulina; disminuye la secreción de glucagón; retarda el vaciamiento gástrico; incrementa la saciedad. *Insulinosecretagogo dependiente de glucosa</p>	<p>Riesgo de pancreatitis. Riesgo de tumores en las células C de la tiroides.</p>
<p>Inhibidores de enzimas α-glucosidasas</p>	 <p>Acarbosa</p>	<p>Inhibición de α-glucosidasas</p> <p>Efecto biológico: Inhibición parcial de la hidrólisis de disacáridos, por lo que retarda la absorción postprandial de monosacáridos.</p>	<p>Inhibe la hidrólisis de disacáridos como la sacarosa, por lo que en caso de hipoglucemia se debe ingerir solo glucosa.</p>



<p>Inhibidor de co-transportadores sodio-glucosa tipo 2 (SGLT-2)</p>	 <p>Canaglifocina</p>	<p>Inhibición del SGLT-2 a nivel renal.</p> <p>Efecto biológico: Glucosuria por inhibición de reabsorción de glucosa renal.</p>	<p>Puede presentarse cetoacidosis, micosis genital, incremento de LDL y fracturas de huesos.</p>
--	--	---	--

2.6.1. Medicina tradicional

La medicina tradicional, complementaria y alternativa (MTC) es utilizada desde hace miles de años para tratar o prevenir algunas enfermedades. Sin embargo, con frecuencia es una parte subestimada de los servicios de salud (OMS, 2013-1).

Los primeros registros escritos acerca del uso de las plantas en la medicina tradicional datan de 2,600 A.C. y existen reportes del sofisticado sistema médico en Mesopotamia que comprende más de 1,000 plantas con fines medicinales. Algunos otros registros corresponde a la medicina egipcia y datan de 2,900 A.C., pero el registro mejor preservado data de 1,550 A.C. ("Papiro de Ebers") e incluye más de 700 preparados a partir de plantas. Otros registros de gran importancia corresponden a la medicina tradicional china; sin embargo, dada la época estos registros solo corresponden a reportes etnomédicos. Es en el siglo XVIII que Anton von Störck y William Withering establecieron las bases de la investigación racional de plantas medicinales, y es hasta el siglo XIX que Friedrich Sertürner logró aislar la morfina, dando paso y precedente a la búsqueda y descubrimiento racional de fármacos y compuestos bioactivos a partir de plantas (OMS, 2013-1).

La búsqueda racional de fármacos y/o compuestos bioactivos a partir de plantas comprende una serie de procedimientos que incluyen la recolección (generalmente en el hábitat natural), identificación taxonómica, preparación de los extractos, evaluaciones farmacológicas y aislamiento y purificación de compuestos. Aunque parece una metodología bien establecida, la búsqueda de compuestos bioactivos presenta desafíos importantes, relacionados con el uso de las plantas como fuente de esos compuestos. Estos desafíos se relacionan con el difícil acceso (recolección), época de recolección y la cantidad de material vegetal colectado; a menudo la cantidad disponible del material vegetal es bajo, lo cual limita las cantidades de compuestos disponibles, siendo a menudo insuficiente para probar una amplia gama de actividades biológicas (OMS, 2013-1).



Si bien el reino vegetal incluye una amplia diversidad de especies vegetales (310, 000) se estima que solo el 6% de ellas ha sido estudiada farmacológicamente y el 15% fitoquímicamente. Por otro lado, de 1,073 nuevas entidades químicas pertenecientes al grupo de pequeñas moléculas que fueron aprobadas entre 1981 y 2010, solo 36% son de origen puramente sintético y el resto son derivados o diseñados a partir de productos naturales, haciendo evidente que los productos naturales son una de las fuentes más importantes de fármacos.

El panorama actual no es tan diferente, si bien la investigación de productos naturales ha crecido, el camino por recorrer es muy grande y las especies vegetales sin estudiar aún son miles. Sin embargo, pese a la poca investigación y poca evidencia científica acerca del potencial farmacológico de las plantas medicinales, su auge y popularidad va en crecimiento haciendo a la medicina tradicional complementaria (MTC) una de las principales alternativas para tratar un gran número de enfermedades (OMS, 2013-1).

En todo el mundo la MTC es el pilar principal de la prestación de servicios de salud o su complemento. Se practica en casi todo el mundo, y su uso va en aumento. Se estima que en algunos países asiáticos y africanos, el 80% de la población depende de la medicina tradicional para recibir atención primaria de salud (OMS, 2013); y de acuerdo a la OMS, a nivel mundial el 70% de la población recurre a la MTC como fuente de atención primaria (Hernández-Galicia et al., 2002).

Históricamente la MTC se ha utilizado para mantener la salud y prevenir y tratar enfermedades. La MTC tiene gran importancia para afrontar el incesante incremento de las enfermedades crónicas no transmisibles, tales como diabetes. En este sentido la medicina tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobadas es una necesidad, ya que contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud (OMS, 2013).

La popularidad de la MTC está en función de su fácil acceso y también debido a la falsa creencia de que «natural» significa «inocuo». Es por ello la gran importancia de políticas basadas en el conocimiento para integrar la MTC en los sistemas nacionales de salud. Más aún, se debería priorizar y apoyar la investigación con el fin de generar esos conocimientos. Si bien los ensayos clínicos controlados aún pueden ofrecer numerosas enseñanzas, otros métodos de evaluación son igualmente valiosos (OMS, 2013).



Es por ello que dos objetivos de este proyecto son establecer el potencial farmacológico de plantas medicinales con potencial antidiabético, y generar conocimiento que permita el uso etnomédico de algunas plantas medicinales.

2.7. Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de DT2

A pesar de los avances y el crecimiento en el desarrollo de nuevos y mejores fármacos para tratar diversos padecimientos, como la DT2, el uso de plantas medicinales es sumamente importante en su tratamiento, no solo en la población indígena o de bajos recursos en nuestro país, sino en la población en general ya que la MTC está tomando auge como alternativa para tratar o coadyuvar al tratamiento farmacológico de diversas enfermedades.

Se estima que en México existen 269 plantas que se emplean de manera empírica para tratar DT2, aunque la información etnomédica acerca de estas es escasa, y en muchos casos ambigua, por lo cual la investigación en este ámbito es de suma importancia (Hernandez-Galicia et al., 2002).

Debido a la gran diversidad de familias botánicas (Figura 18), se tiene una amplia variedad de principios activos a los que se les atribuyen propiedades antidiabéticas y/o hipoglucemiantes, siendo los flavonoides, terpenoides, cumarinas y alcaloides algunos de los compuestos responsables de esas actividades (Hernandez-Galicia et al., 2002; Ortiz, 2008).

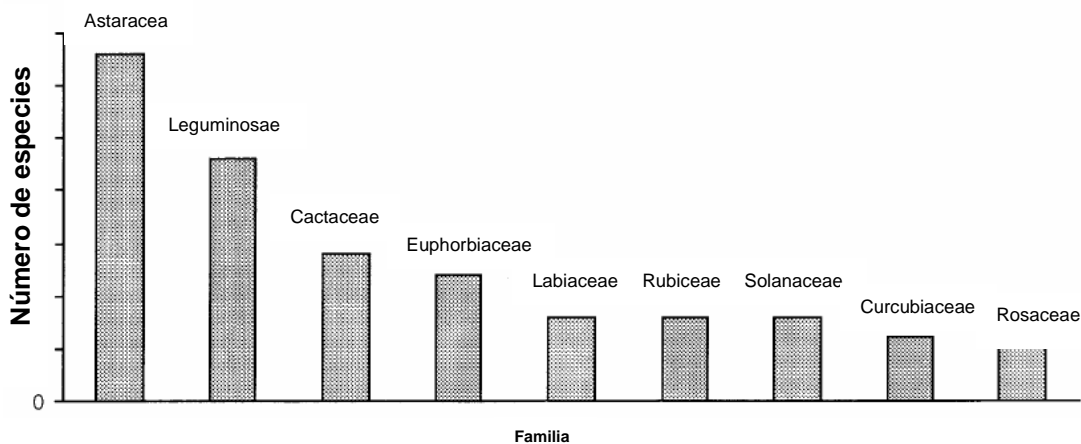


Figura 18. Familias botánicas con la mayor cantidad de especies de plantas utilizadas en la MTC mexicana para el control de Diabetes (Tomado de: Hernández-Galicia et al., 2002).

Dentro del gran número de plantas medicinales empleadas para tratar la DT2 se encuentran *Plantago australis* y *Achillea millefolium* las cuales se describen a continuación.

2.7.1. *Plantago australis* Lam. subsp. *hirtella* (Kunth) Rahn



Figura 19. Fotografía de *Plantago australis* (Tomado de: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; <http://nzpcn.org.nz>, <http://www2.darwin.edu.ar>).

Plantago australis, conocida como gusanillo es una planta perenne de la familia *Plantaginaceae* (Palmeiro et al., 2002). *P. australis* alcanza hasta 40 cm de altura con hojas angostas, de color verde pálido y miden hasta 26 cm de largo que crecen en la base de la planta. Las flores son de color café y están agrupadas en espigas (Figura 19). Los frutos son unas capsulitas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.7.1.1. Antecedentes etnomédicos

En la medicina tradicional de algunos países *P. australis* suele emplearse como laxante, diurético, anti-inflamatorio, anti-bacterial y cicatrizante (Palmeiro et al., 2002). En México, se usa para trastornos del aparato digestivo, para 'desinflamar' los riñones y pulmones, trastornos de la garganta y cáncer, y también para el control de la diabetes (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Monroy y Castillo, 2007).

2.7.1.2. Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos

Algunos estudios fitoquímicos han demostrado que varios de los metabolitos secundarios de *P. australis* incluyen compuestos fenólicos como el verbascósido, conocido como



acteósido. Estructuralmente este compuesto está conformado por: ácido cafeico, 4,5-hidroxifeniletanol unido a β -(D)-glucopiranosido, una agrupación ramnosa y una molécula de glucosa (de Moura-Sperotto et al., 2018).

Las hojas de *P. australis* contienen plantanósido y verbacósido, en la semilla y la planta completa se ha reportado el monoterpene auncubósido (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Por otro lado, en cuanto a las actividades farmacológicas reportadas para esta especie, destacan el potencial analgésico y anti-inflamatorio de extractos etanólicos de hojas, raíces y frutos (Palmeiro et al., 2002). Otros estudios también demostraron que un extracto hidroalcohólico estandarizado de *P. australis* (verbascósido, 6%) posee propiedades anti-inflamatorias y cicatrizantes (de Moura-Sperotto et al., 2018).

En cuanto al potencial toxicológico de esta especie, se tienen reportes de su potencial hepatotóxico en un estudio de toxicidad subcrónica (60 días) a dosis de 850 y 1700 mg/kg. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan establecer la toxicidad de *P. australis* (Palmeiro et al., 2003).

Estudios realizados en el grupo de trabajo de Estrada-Soto por Ornelas-Mendoza (2018) demostraron que el EHAPa (100, 160 y 330 mg/kg) disminuye de manera significativa el pico hiperglucémicos en CTG en ratones normoglucémicos, así como, el porcentaje de variación de la glucosa en el modelo de DENID sugiriendo la participación de mecanismo insulinosensibilizadores. Por otro lado, se realizaron ensayos de toxicidad aguda (5, 50, 300 y 2,000 mg/kg) y toxicidad subcrónica (28 días, 100 mg/kg) los cuales no mostraron evidencias de procesos toxicológicos aparentes.

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



2.7.2. *Achillea millefolium* L.



Figura 20. Fotografía de *Achillea millefolium*. Poblado de Tres Marías, Morelos en el mes de junio de 2014.

Achillea millefolium es una hierba erecta, de 25 a 90 cm de altura, tiene muchas ramas. Las hojas son alargadas y están finamente divididas. Las flores están en cabezuelas como las margaritas de color blanco y son aromáticas (figura 20). Generalmente crece asociada a bosques tropicales caducifolio y sub-caducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino ([Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009](#)).

2.7.2.1. Antecedentes etnomédicos

Achillea millefolium se emplea en la medicina tradicional como anti-inflamatorio y en desórdenes gastrointestinales, hepatobiliares, así como en problemas cardiovasculares y respiratorios ([Dall'Acqua et al., 2011](#); [Li et al., 2011](#)). En México, el uso más popular de la especie es aliviar el dolor de oídos, también en el tratamiento de la tos, dolor de cabeza e insomnio. Otros usos son en heridas, nervios, golpes, dolores menstruales, para lavar granos, llagas, y como analgésico ([Chávez-Silva et al., 2018](#); [Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009](#)).

2.7.2.2. Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos.

Las ramas y las flores de *A. millefolium* contienen un aceite esencial rico en mono y sesquiterpenos. Del primer grupo de compuestos se han encontrado la iso-cetona de artemisia, borneol, su acetato, δ -cadineno, camfeno, alcanfor, cineol (sólo en las ramas), cuminaldehído, paracimeno, limoneno, mentol, mirceno, ocimeno, α - y β -pineno, sabineno, terpinenol, α -terpineno, terpineol, terpinolena y α -tujona y triciclono (sólo en las ramas). También se han identificado los sesquiterpenos azules, cariofileno. cariofilenol



y humuleno, y sólo en el aceite esencial de las ramas achillicina, achillina, su derivado hidroxilado, 8-acetoxi-artabsina, 8-angeloil-oxi-artabsina, austrina, balchanólido, su derivado acetilado, gamma-cadineno, chamazuleno, ácido chamazulen-carboxílico, farneseno, guaiazuleno, leucodín, dihidroxi-deacetoxi-matricín, milletín, millefolide y γ -muroleno. Los componentes fenólicos eugenol y ácido salicílico y ácido iso-valérico se han aislado de las ramas, y los flavonoides artemetín, casticín, el triterpeno arnidol, y el β -sitosterol de la inflorescencia ([Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009](#)).

En las hojas se han detectado los flavonoides apigenina, 3-metil-butulefol, centauredina, pectolinarigenina e iso-ramnetina y los lignanos ácidos clorogénico y cafeoil-quínico. De las ramas se han extraído el alcaloide estaquidrina; el diterpeno fitol, los triterpenos α - y β -amirina y taraxasterol; los esteroides campesterol, estigmasterol y β -sitosterol; y el flavonoide glucósido de luteolín ([Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009](#)).

En estudios realizados recientemente por el grupo de Mata y colaboradores se analizaron los componentes volátiles de *A. millefolium*, encontrando que, en contraste con las plantas cultivadas alrededor del mundo, el aceite esencial de las plantas adquiridas comercialmente en los mercados de la Ciudad de México tiene elevadas cantidades de α -tujona, un compuesto neurotóxico. Por otro lado, se analizó la infusión de las partes aéreas de la planta y las fracciones orgánicas, lo que permitió demostrar la presencia de metoxiflavonas y lactonas sesquiterpénicas en la misma. Las lactonas se caracterizaron como leucodina, aquilina y matricarina; en tanto las flavonas como la 5-hidroxi 3,4',6,7-metoxiflavona, la artemetina y la casticina ([Martínez-Aldino, 2019](#)). Cabe destacar que las lactonas sesquiterpénicas son el marcador quimiotaxonómico de la especie ([Chávez-Silva et al., 2018](#)).

En cuanto a la actividad farmacológica para *A. millefolium* se encuentran reportes de su potencial antioxidante ([Baggio et al, 2016](#); [Chou et al., 2013](#)), antimicrobiano ([Candan et al., 2003](#)), anti-inflamatorio ([Benedek et al., 2007b](#)), estrogénico ([Innocenti et al., 2007](#)), vasoprotector y broncodilatador ([Dall'Acqua et al., 2011](#); [Koushyar et al., 2013](#)), gastroprotector ([Potrich et al., 2010](#); [Cavalcanti et al., 2006](#)), hepatoprotector, antispasmodico, antagonista de los canales de calcio ([Yaesh et al., 2006](#)), diurético ([de Souza et al., 2013](#)), ansiolítico ([Baretta et al., 2012](#)), e inhibidor de las enzimas



glucosidasas y lipasas (Ramirez et al., 2012). También se tienen reportes de su acción anticonvulsiva en ratón, también se observó el efecto antipirético de un extracto acuoso y del jugo obtenido de las ramas, administrados por vía oral a 50 y 25 g/kg, respectivamente. El extracto acuoso de las ramas fue activo contra el nemátodo *Meloidogyne incognita* y el extracto clorofórmico tuvo actividad antibiótica contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* y el hongo *Candida albicans* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Estudios realizados por el grupo de trabajo del Dr. Estrada-Soto se determinó el efecto vasorrelajante de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico e hidroalcohólico de *A. millefolium* en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta de rata con y sin endotelio precontraídos con noradrenalina. Donde el extracto que mostró la mayor actividad fue el hexánico, el cual indujo un efecto vasorrelajante dependiente de la concentración y de la presencia de endotelio y el mecanismo de acción encontrado está relacionado con el sistema NO/GMPc y con la potencial liberación de prostaglandinas (PGI₂) a través de la activación de la ciclooxigenasa tipo 1 (COX1) (Arias-Duran, 2015).

Por otro lado, se determinó el efecto de los extractos orgánicos e hidroalcohólico de *A. millefolium* en un modelo *ex vivo* de tráquea aislada de rata. El extracto con mayor actividad fue el hexánico, al cual induce su efecto relajante a través de un antagonismo de tipo no competitivo hacia los receptores muscarínicos, además, también se encuentra involucrada la vía NO/GMPc en el proceso de relajación y la disminución de la entrada de calcio extracelular, mediante un bloqueo de influjo de calcio hacia el interior de las células de músculo liso e inhibición de la movilización de calcio de los almacenes intracelulares (Arias-Duran, 2018). Estos resultados dieron pauta a estudiar con mayor profundidad los posibles mecanismos de acción de los extractos obtenidos de tallo, flor, raíz, y hoja sobre anillos de tráquea aislada de ratas precontraídos con carbacol. Se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación de dichos extractos donde los extractos hexánicos (EH) de flor y de raíz presentan mayor efecto traqueorrelajante, ambos extractos actúan como antagonistas no competitivos de los receptores muscarínicos, siendo el bloqueo de los canales de calcio el principal mecanismo de acción. Además, se demostró leucodina se encuentra en el extracto de la flor, considerándolo como uno de los principales responsables de la actividad farmacológica (Hernández-Morales, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es una pandemia que afecta a 451 millones de personas en el mundo (18-99 años) y este número va en crecimiento de forma alarmante. Por otro lado, con el aumento de la obesidad y la inactividad física infantil la aparición de casos de DT2 en niños y adolescentes es cada vez más frecuente, teniendo el potencial de convertirse en un problema de salud pública en este sector de la población (FID, 2017).

Es importante destacar que un gran problema de la DT2 es el inadecuado control glucémico y la falta de adherencia al tratamiento, consecuencia de las reacciones adversas a los fármacos, pero sobre todo a que el tratamiento es de por vida. Esto conduce a tener hiperglucemia persistente, incrementando el riesgo de desarrollar complicaciones diabéticas incapacitantes y letales, lo que también contribuye a elevar los costos de la atención sanitaria y disminuir la calidad de vida del paciente y de su núcleo de apoyo. Esta enfermedad es una de las 10 principales causas de muerte a nivel mundial (FID, 2017).

En este sentido algunos estudios revelan que pacientes con determinados trastornos crónicos utilizan servicios de MTC con mayor frecuencia (OMS, 2013).

Es por ello que este proyecto pretende demostrar la actividad antidiabética atribuida a las plantas medicinales *Plantago australis* y *Achillea millefolium*, así como generar conocimiento y aportar bases farmacológicas y toxicológicas que den sustento a su uso y seguridad en el tratamiento de la DT2. Por otro lado, este proyecto también permitirá aportar nuevos compuestos bioactivos como prototipos y/o potenciales fármacos que brinden mejores resultados farmacológicos y menos reacciones adversas en ese padecimiento.



4. HIPOTESIS

Con base en los antecedentes etnomédicos de las especies vegetales *P. australis* y *A. millefolium*, se demostrará que estas poseen actividad antihiper glucémica y mostrarán seguridad farmacológica en modelos *in vivo*.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el potencial efecto antihiper glucémico e hipoglucemiante de las especies vegetales *Plantago australis* y *Achillea millefolium* mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, así como determinar el perfil toxicológico y fitoquímico preliminar del extracto más activo con el fin de establecer la seguridad y eficacia en sus usos medicinales.

5.2. Objetivos específicos

- Obtener los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las especies vegetales *A. millefolium* y *P. australis*.
- Evaluar el efecto antihiper glucémico e hipoglucemiante de los extractos en ratones normoglucémicos por Curvas de Tolerancia a la Glucosa (CTG).
- Evaluar *in vitro* la potencial actividad inhibitoria de los extractos sobre α -glucosidasas aisladas de rata y corroborar ese efecto por Curvas de Tolerancia a la Sacarosa (CTS).
- Determinar la influencia del extracto más activo sobre la expresión de PPAR γ y el GLUT-4 en la línea celular 3T3-L1.
- Corroborar el posible efecto hipoglucemiante del extracto más activo y la participación de la liberación de insulina y calcio en células RINm5F.
- Establecer el potencial efecto antidiabético de los extractos más activos en el modelo agudo de diabetes experimental no insulino dependiente (DENID).
- Realizar los estudios toxicológicos agudo y subagudo del extracto más activo.
- Determinar el perfil fitoquímico preliminar del extracto más activo.

6. METODOLOGÍA

6.1. Recolección y preparación del material vegetal

Las especies vegetales empleadas en este proyecto fueron *Achillea millefolium*, colectada por el Dr. Guillermo Ramírez Ávila del Centro de Investigación Biomédica del SUR-IMSS (CIBIS-IMSS), y *Plantago australis*, colectada por la Dra. Irene Perea Arango del Centro de Investigaciones en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CEIB-UAEM). Ambas especies fueron identificadas taxonómicamente por la Dra. Irene Perea Arango.

6.2. Obtención de los extractos orgánicos

Las especies vegetales fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente. Posteriormente, *A. millefolium* y *P. australis* fueron fragmentadas en un molino mecánico provisto de cuchillas diseñadas para tal fin.

Los extractos etanólicos fueron obtenidos a partir del material vegetal seco y molido de cada planta por maceración exhaustiva con disolventes en orden creciente de polaridad (hexano, diclorometano y etanol) durante 72 horas, por triplicado. Por otro lado, para la obtención del extracto hidroalcohólico el material vegetal seco y molido se maceró durante 72 horas por triplicado con una mezcla etanol/agua (70/30, v/v). Finalmente cada extracto fue filtrado y llevado a sequedad a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador de la marca Buchi (Figura 21).

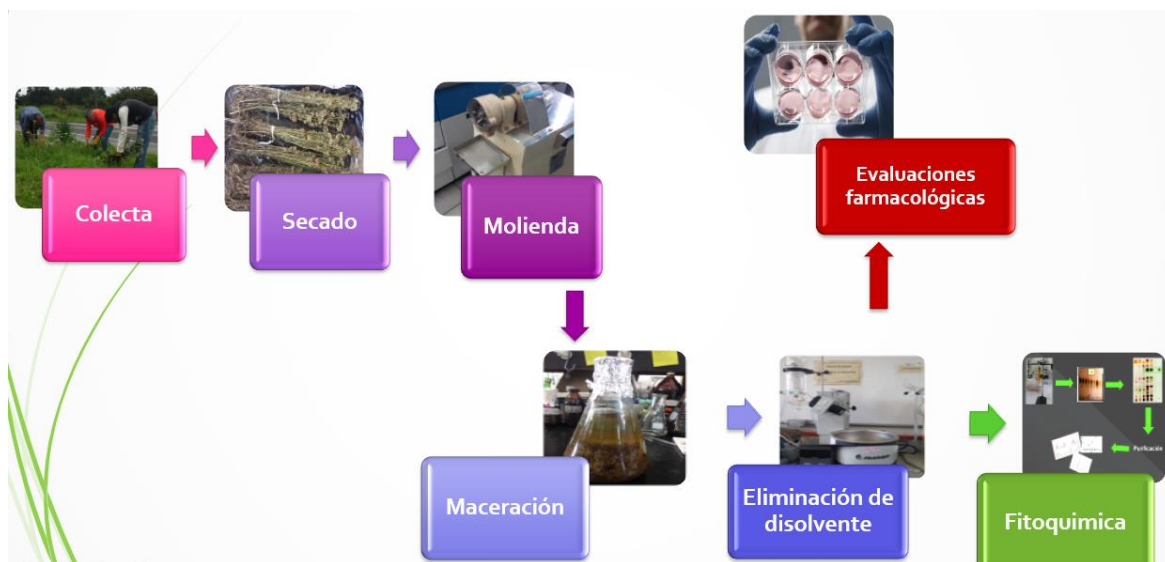


Figura 21. Diagrama general de trabajo.

6.3. Evaluaciones farmacológicas: ensayos *In vivo*

6.3.1. Uso y manejo de animales

Los ratones empleados en este proyecto fueron macho de la cepa CD1 (25-30 g), proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina (UAEM). Los ratones se mantuvieron en condiciones de laboratorio con ciclos de 12 h luz/oscuridad. Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con nutricubos (Purina) y agua purificada. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Manejo y Experimentación de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Este protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I).

6.3.2. Curva de tolerancia a glucosa y sacarosa

Con el fin de determinar el efecto postprandial sobre la glucemia se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa y sacarosa de cada extracto, de acuerdo con Ortiz *et al.*, (2007). Se emplearon ratones normoglucémicos con ayuno de 16 h y agua *ad libitum*. Previa administración, se midió la glucemia al tiempo 0 (G_0), y se administró por vía intragástrica (i.g.) una carga de 2 g/kg de sacarosa o glucosa, según correspondió. Posteriormente, se formaron tres grupos (n=6) a los cuales se les administró: Grupo vehículo: agua inyectable (AI), grupo de prueba: extracto (100 mg/kg), grupo control: glibenclamida (5 mg/kg) para las CTG y acarbosa (3 mg/kg) para las CTS. La glucemia se monitoreó con un glucómetro Accu-Chek, Performa (Roche) a las 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas (figura 22).

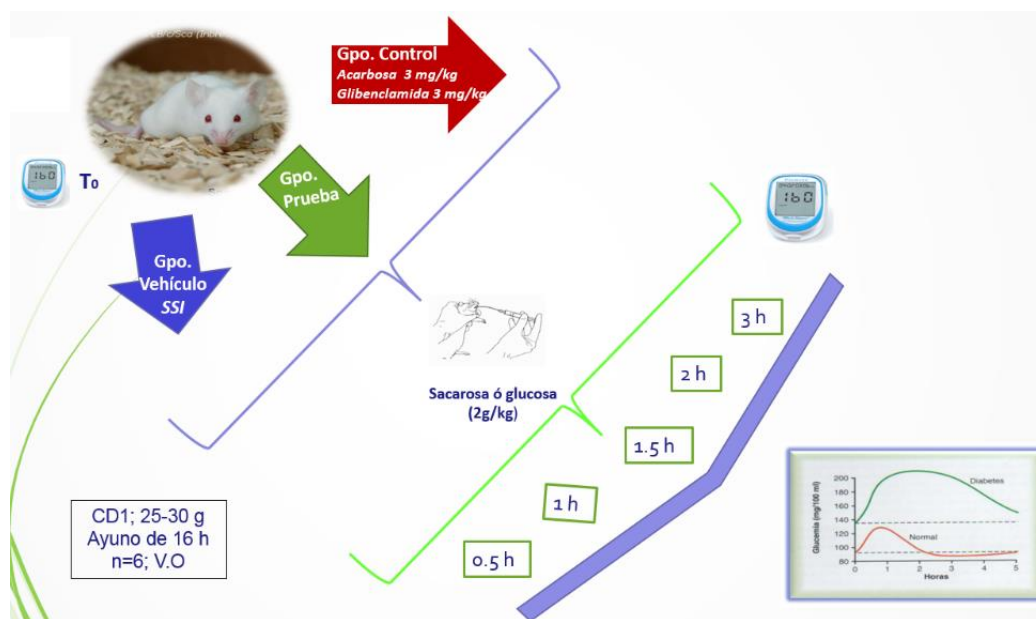


Figura 22. Curvas de tolerancia a la glucosa y sacarosa.



Finalmente, para las hacer las gráficas se calculó el porcentaje de variación de glucosa con relación a la glucosa inicial (G_0) de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{variación de glucemia} = [(G_x - G_0) / G_0] \times 100$$

Donde:

G_0 : glucosa al tiempo 0

G_x : glucosa a cada tiempo

6.3.3. Diabetización

Para determinar el efecto antidiabético se indujo el modelo de DENID (Hayashi et al., 2006). En ratones con ayuno de 8 horas y agua *ad libitum* se administró intraperitonealmente (i.p) 20 mg/kg de nicotinamida, y transcurridos 15 min se administró 120 mg/kg de estreptozotocina, i.p., disuelta en buffer de citratos recién preparado, a pH 4.5. Dos semanas después se determinó la glucemia y para las evaluaciones se eligieron a los ratones con glucemia superior a 180 mg/dL (figura 23).

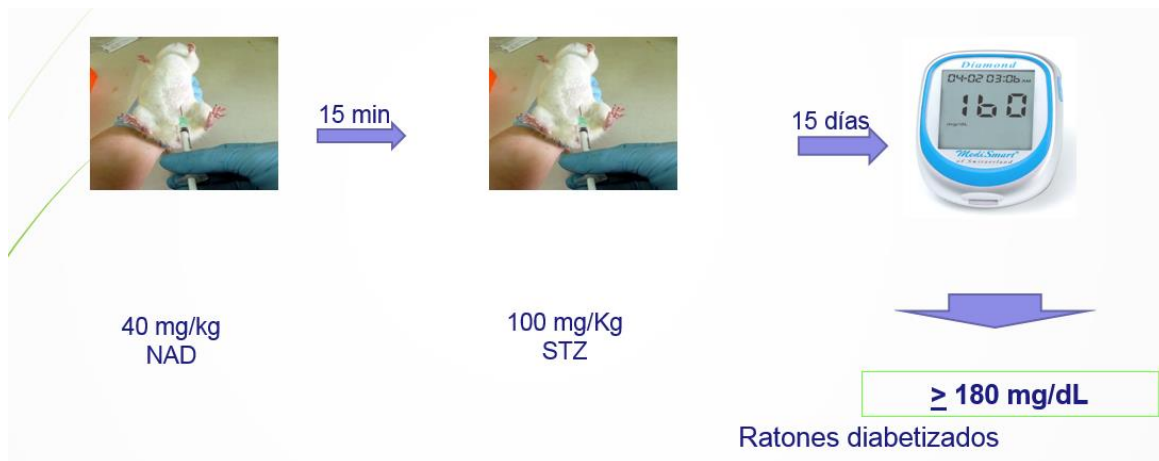


Figura 23. Diabetización de ratones normoglucémicos.

6.3.4. Determinación del efecto antidiabético agudo

La evaluación aguda se hizo en ratones con ayuno de 13 horas. Se formaron tres grupos ($n=6$) y se determinó la glucemia basal (G_0). Posteriormente, cada grupo fue administrado: Grupo vehículo: Agua inyectable (AI), grupo de prueba: Extracto (100 mg/kg), grupo control: glibenclamida (5 mg/kg). La glucemia fue monitoreada con un glucómetro comercial (Accu-Chek, Performa; Roche) a las horas 1, 3, 5 y 7 horas post-administración (figura 24). Finalmente se calculó el porcentaje de variación de glucosa y se construyeron las curvas correspondientes.



Figura 24. Esquema del ensayo antidiabético agudo.

6.4. Estudio toxicológico.

6.4.1. Toxicidad aguda.

Para determinar el posible efecto letal agudo del extracto a diferentes dosis, se llevó a cabo el ensayo toxicidad aguda de acuerdo al apartado 425 (con algunas modificaciones) de la Guía de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 2008).

Para el ensayo se formaron cuatro grupos de ratones ($n=3$) con ayuno de 8 horas y agua *ad libitum*. A cada grupo se administró el extracto más activo a las dosis de: 5, 50, 300 y 2000 mg/kg. Los ratones tratados se mantuvieron en observación durante 24 horas y se estableció el número de muertes a cada dosis y se categorizó de acuerdo al Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado (SGH) (figura 25).



Figura 25. Esquema del ensayo toxicológico agudo.

6.4.2. Toxicidad sub-crónica.

Por otra parte, para observar el efecto del extracto más activo por tras la administración sub-crónica sobre los principales órganos metabolizadores (hígado, riñón y corazón), se hizo el estudio toxicológico sub-crónico de acuerdo al apartado 407 de la OECD (Hernández-Vázquez et al., 2017; Ávila-Villarreal et al., 2016).

Se formaron dos grupos de ratones (n=10) administrados diariamente a la misma hora durante 28 días, grupo vehículo: agua inyectable, grupo de prueba: extracto más activo (100 mg/kg). Al término de este periodo, los ratones fueron sedados con pentobarbital sódico y, por punción cardíaca, se extrajo la sangre para determinar la Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanino aminotransferasa (ALT). Después se extrajeron hígado, riñón y corazón, órganos implicados en el metabolismo de xenobióticos, los tejidos se fijaron con formol al 10% para la histología correspondiente y determinar la posible toxicidad (figura 26).

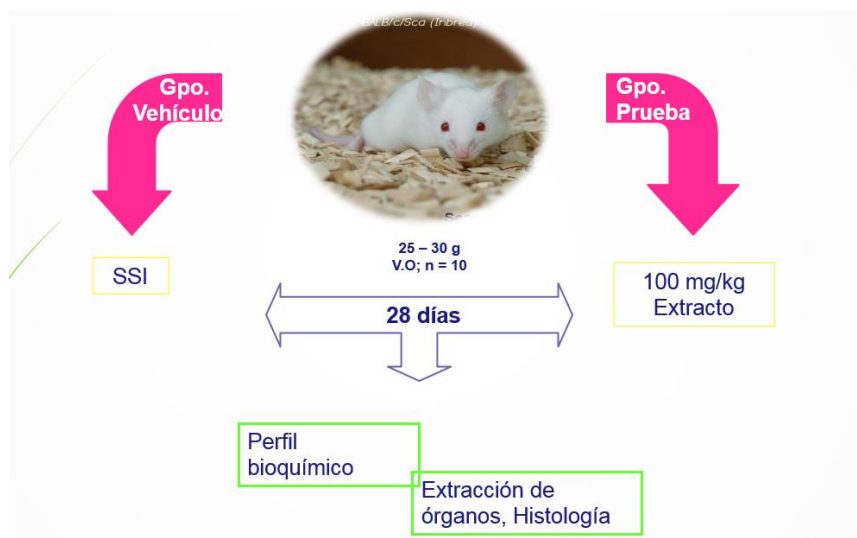


Figura 26. Esquema del ensayo toxicológico sub-crónico.

6.5. Evaluaciones farmacológicas: ensayos *In vitro*.

6.5.1. Ensayo de inhibición de las α -glucosidasas.

Para obtener las α -glucosidasas intestinales se usaron ratas macho de la cepa Wistar (150-200 g) con ayuno de 8 horas y agua *ad libitum*, anestesiadas con pentobarbital sódico y sacrificadas por dislocación cervical. Se disecó el intestino delgado y se lavó con solución salina al 0.9% y buffer de fosfato de sodio, pH 7 adicionada con 5 mg de penicilina/estreptomicina (Invitrogen®).

El intestino delgado aislado y limpio se cortó longitudinalmente, y la mucosa interna fue removida mecánicamente sobre una superficie de cristal mantenida a -2 °C. El material obtenido se mezcló con un homogeneizador de tejido (Corning®) y almacenado en crioviales de 4 mL a -25°C, previa cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Para determinar la inhibición de las α -glucosidasas, se empleó como el sustrato almidón de maíz (12.5 mg/mL) en 250 μ L de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.0), mezclado con el vehículo (AI), los extractos de prueba (1 mg/mL) o el control positivo (extracto hidroalcohólico de *Camelia sinensis* (EHACs, 1 mg/kg)). Posteriormente, inició la reacción adicionando 10 μ L del homogenizado de mucosa intestinal y se incubó a 37 °C por 10 minutos, la reacción finalizó al adicionar 12.5 μ g de acarbosa e incubando en hielo. Finalmente, se determinó la glucosa con un kit comercial de glucosa oxidasa (Glucose GOD-PAD). La actividad inhibitoria de los extractos se reportó como el porcentaje de actividad residual. Todos los ensayos fueron realizados por cuadruplicado (figura 27).



Figura 27. Ensayo de inhibición de α -glucosidasas *in vitro*.

6.5.2. Determinación de la expresión relativa de RNAm.

Para este experimento se siguió la metodología descrita por Hidalgo-Figueroa et al., (2013), donde se usaron fibroblastos de ratón Swiss (3T3-L1), cultivados en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 25.5 mM de glucosa, en botellas de cultivo de 75 cm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de humedad.

Previo al ensayo de expresión de RNAm, se determinó la funcionalidad con el kit CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). El fundamento se basa en el uso del MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS], un compuesto que al ser reducido se transforma en formazán. La reducción se relaciona con la actividad de las deshidrogenasas celulares. La concentración del formazán se midió a 490 nm absorbancia y es proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Para la prueba de funcionalidad de adipocitos se emplearon las concentraciones de 1, 10 y $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los extractos.

Los resultados de funcionalidad se expresaron en porcentaje \pm EEM y se consideraron las concentraciones cercanas al 100%.

Posteriormente, los fibroblastos 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos para lo cual, estos fueron sembrados en placas de cultivo con medio DMEM con 25.5 mM de glucosa, 1 mM



de piruvato de sodio, 2 mM de glutamina, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), en atmosfera del 5% de CO_2 a 37 °C. Dos días después, adicionó metilhidroxibutilxantina (MIX, 0.5 mM), dexametasona (DX, 0.25 μM) e insulina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en DMEM con 10% SFB. Posteriormente (segundo día), el medio adicionado a las células estuvo libre de MIX y DX y se adicionaron 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de insulina; el siguiente cambio de medio fue bajo las mismas condiciones. A partir del cuarto día el cambio de medio fue con DMEM libre de insulina y fue reemplazado cada dos días hasta observar confluencia de adipocitos del 80%. Al octavo día de su diferenciación las células fueron usadas en la evaluación de los extractos.

Las células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos se trataron 24 horas con los diferentes extractos y controles, una vez transcurrido este tiempo se procedió a la extracción del RNA usando trizol (solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, y otros componentes), que facilita la ruptura de la membrana plasmática y el aislamiento del RNA de alto y bajo peso molecular. Después de homogenizar las células con trizol, se adicionó cloroformo para formar una fase superior clara que contenía el RNA, una interfase, y una fase inferior roja que contiene el DNA y proteínas. El RNA total se precipitó con isopropanol, se cuantificó en el NanoDrop 2000 (ThermoScientific), y se sometió a la reacción de transcripción en reversa (RT).

La RT permitió sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de RNA total, por la transcriptasa reversa usando 2 μg de RNA total de las células y los iniciadores al azar ('random primers' 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). 20 μL de reacción se incubó en un termociclador, con el siguiente programa de ciclos: inicio 25 °C/5 min, extensión a 42 °C/55 min, la reacción se detuvo inactivando la enzima a 70 °C por 15 min y enfriando a 4 °C por 5 min.

El cDNA se amplificó por DNA polimerasa para cada uno de los genes a estudiar. Se emplearon cebadores diseñados de secuencias de genes de *Mus musculus*.

La amplificación empleó SYBR Green con el equipo Rotor Gene 3000. La mezcla de reacción (10 μL) tuvo oligonucleótidos 0.5 mM de los genes descritos y la mezcla de reacción 1X con la enzima Fast Start amortiguada para PCR, SYBR Green y MgCl_2 3.5 mM. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización, 95 °C/10 segundos; alineamiento 61 °C/7 segundos; y elongación, 71 °C/10 segundos (figura 28).

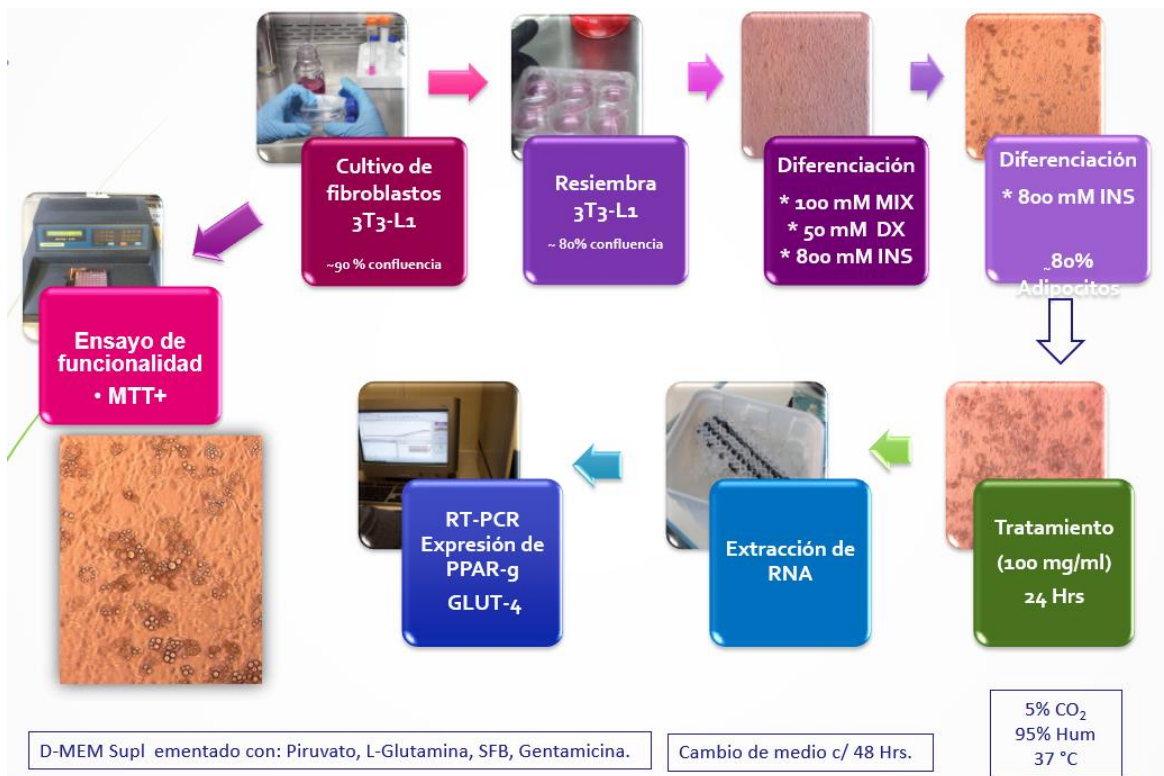


Figura 28. Determinación de la expresión relativa de GLUT-4 y PPAR γ en fibroblastos 3T3-L1.

Para comprobar el producto de PCR, así como verificar las condiciones de la reacción y la especificidad de los cebadores, se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

6.5.3. Cuantificación de calcio intracelular.

Con el fin de observar el liberación de calcio intracelular se emplearon células RINm5f, crecidas en monocapa y mantenidas en medio RPMI 1640 (glucosa 11.1 mM) (GIBCO™), suplementado con 10% SFB (ATCC), 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio y 2 mg/mL gentamicina (Invitrogen, CA, EUA). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmosfera de 5% CO₂/95% de humedad en botellas de plástico (Nunc™). El medio fue reemplazado cada tercer día (Miranda-Pérez et al., 2016).

Para el ensayo, 24 horas antes las células se incubaron 30 minutos con 1 μ M del marcador de calcio Fluo-4AM (Molecular Probes, OR, US) en HBSS, suplementado con 10 μ g/mL de gentamicina y 0.1% de BSA, finalmente las células fueron lavadas con medio.



La fluorescencia fue medida a 488 nm de excitación y 535 nm de emisión usando un microscopio confocal (Zeiss Zen-Sp1, Oberkochen, Germany) con escaneo láser. Las imágenes se capturaron cada segundo con tiempos de exposición de 20 ms por 10 minutos a 23 °C. Posteriormente, se adicionaron las muestras según correspondió: vehículo (medio de cultivo), control (glibenclamida 400 μ M) o muestra de prueba (200 μ g/mL, EHiAm) y se tomaron 5 imágenes en cada secuencia. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ de los NIH, EUA (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Los cambios en la fluorescencia relativa ($\Delta F/F_0$) se graficaron en función del tiempo e integraron para determinar el área bajo la curva. Para determinar el contenido de Ca^{2+} intracelular se empleó el método de Bellomo et al. (1982), basado en la cuantificación espectrofotométrica del complejo de arsenazo III (ácido 2,2'-(1,8-Dihidroxi-3,6-disulfonaftileno-2,7-bisazo)bisbencenearsonico) y Ca^{2+} intracelular libre. 5 μ l de fracción citosólica fue tomada y se adicionó 1 mL del indicador preparado con 5 mM de HEPES a pH 7.4. El complejo formado por arsenazo III- Ca^{2+} fue leído a una longitud de 675 y 685 nm (figura 28). El Ca^{2+} intracelular fue determinado usando la siguiente ecuación:

$$C = \Delta Abs / (\epsilon - \epsilon') \cdot l$$

Donde:

C es la concentración de Ca^{2+} .

ΔAbs es 675-685 nm.

ϵ es el coeficiente de la extinción molar ($2.80 \times 10^{-4}/cmM$) del complejo de Arsenazo III- Ca^{2+}

ϵ' es el coeficiente de extinción molar ($0.19 \times 10^{-4}/cmM$) del calcio libre-arsenazo III

l es el espesor de la celda.

Los resultados fueron expresados como el calcio intracelular mol/mg de proteína.

6.5.4. Determinación de secreción de insulina.

Las células RINm5F al 70-80% de confluencia en cajas Lab-Tek II pre-incubadas por 2 h a 37 °C con buffer de bicarbonato Krebs-Ringer HEPES (KRBH, NaCl 135 mM, KCl 3.6 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, NaH_2PO_4 0.5 mM, $MgCl_2$ 0.5 mM, $CaCl_2$ 1.5 mM, y HEPES 10 mM, pH 7.4%, 10% BSA, glucosa 5.5 mM). Las células se estimularon con HAEAm (200 μ g/mL) o con el control positivo glibenclamida (400 μ M) (figura 29). La insulina se determinó con un kit de ELISA para insulina (ALPCO, Mexico City, México) y normalizados con respecto a la insulina total de los islotes (Miranda-Perez et al., 2016).

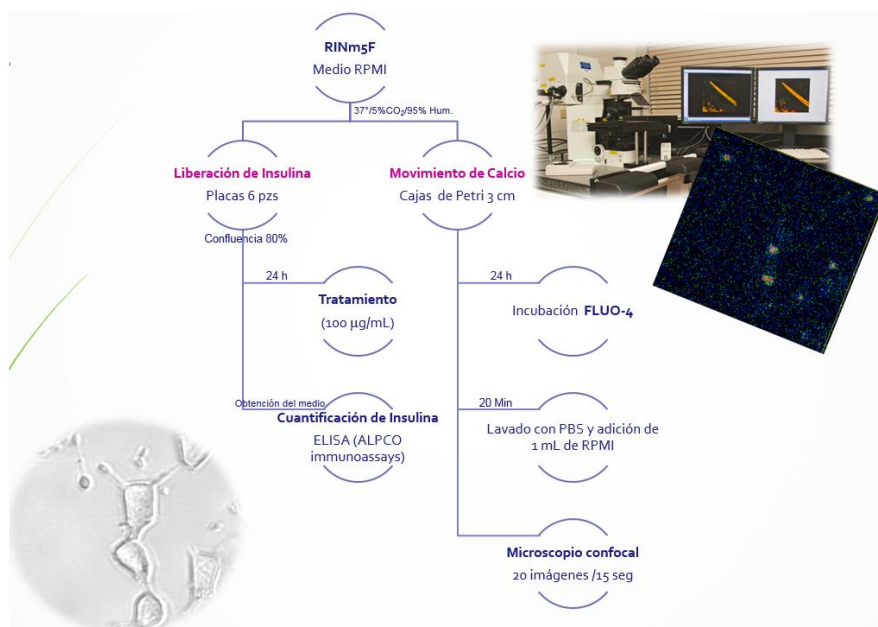


Figura 29. Esquema de la metodología para la cuantificación de insulina y calcio.

6.6. Análisis estadístico.

Los efectos de cada tratamiento se expresaron, para los ensayos *in vivo*, como el promedio del número de ratones en cada ensayo \pm error estándar (EEM), y para los ensayos *in vitro* al promedio del número de repeticiones \pm EEM. Para comparar el tratamiento vs. el vehículo se estableció como diferencia significativa $*p < 0.05$ y con el programa GraphPad Prism 5. Para analizar el porcentaje de variación de glucosa se empleó el análisis de varianza (ANOVA) seguida de una post-prueba de Bonferroni. Para el resto de los ensayos se usó ANOVA con la post-prueba de comparaciones múltiples de Dunnett's.

6.7. Estudio fitoquímico preliminar.

Para aislar alguno de los compuestos responsables de la actividad farmacológica de los extractos más activos, se fraccionaron los extractos por cromatografía en columna abierta. El gel de sílice fue la fase estacionaria y mezcla de disolventes en gradiente de polaridad creciente la fase móvil. El proceso de separación fue monitoreado por cromatografía de placa fina y los agentes reveladores sulfato sérico y lámpara de luz U.V. Las fracciones obtenidas se juntaron por similitud cromatográfica en capa fina para reducir el número de fracciones primarias. Una vez puros los compuestos, se emplearon técnicas espectrométricas y espectroscópicas para su elucidación estructural (figura 30).

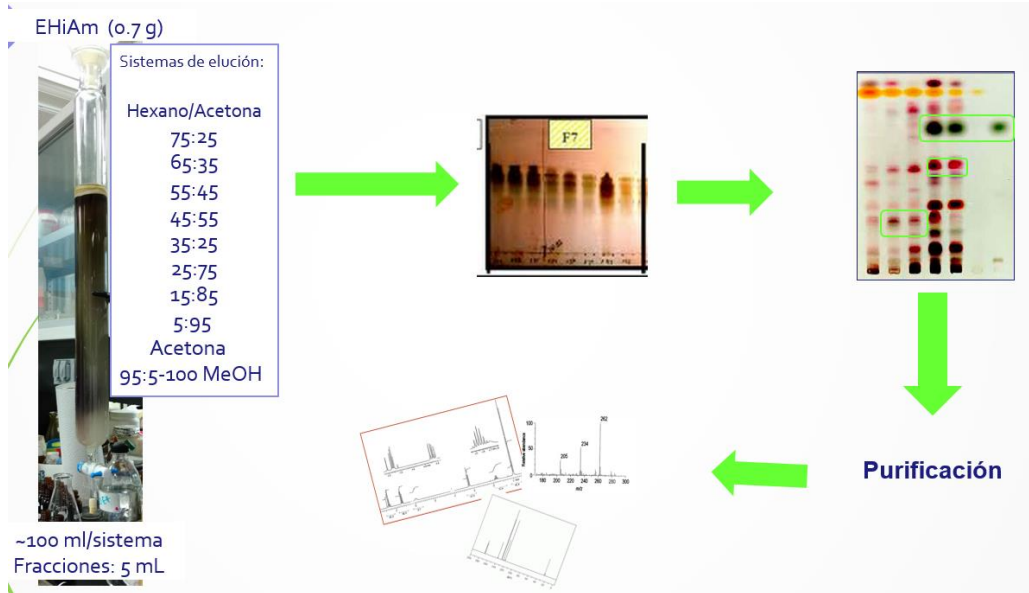


Figura 30. Determinación del perfil fitoquímico preliminar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

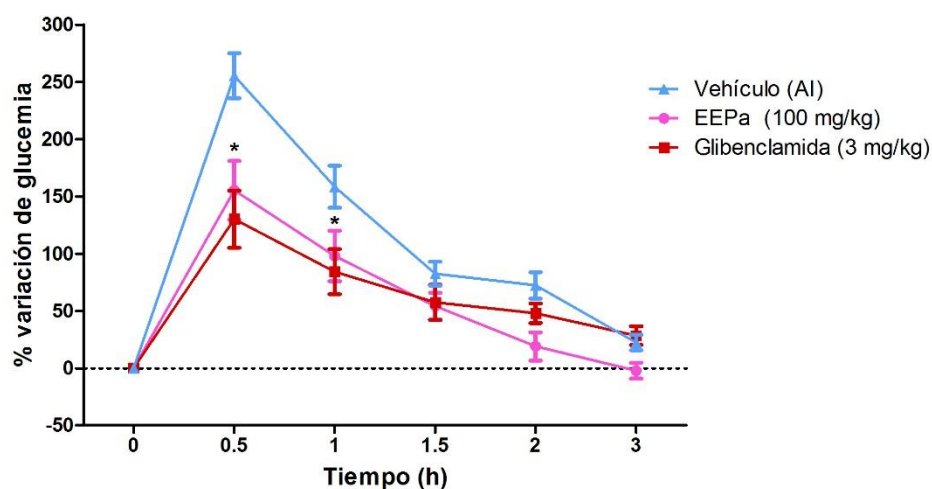
Actualmente se tienen pocos estudios científicos que den sustento al potencial farmacológico, toxicológico y composición química de *Plantago australis* y *Achillea millefolium*, ambas plantas son empleadas en el tratamiento de DT2 (Akram, 2013; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Petlevski et al., 2001; Ramírez et al., 2012; Samuelsen, 2000).

Por lo que en este proyecto se determinó el potencial antidiabético de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de esas especies, mediante curvas de tolerancia a azúcares y ensayos antidiabéticos en el modelo DENID, así como la toxicidad y fitoquímica preliminar del extracto más activo.

7.1. Parte farmacológica: Evaluaciones *in vivo*

7.1.1. Curvas de tolerancia a la glucosa

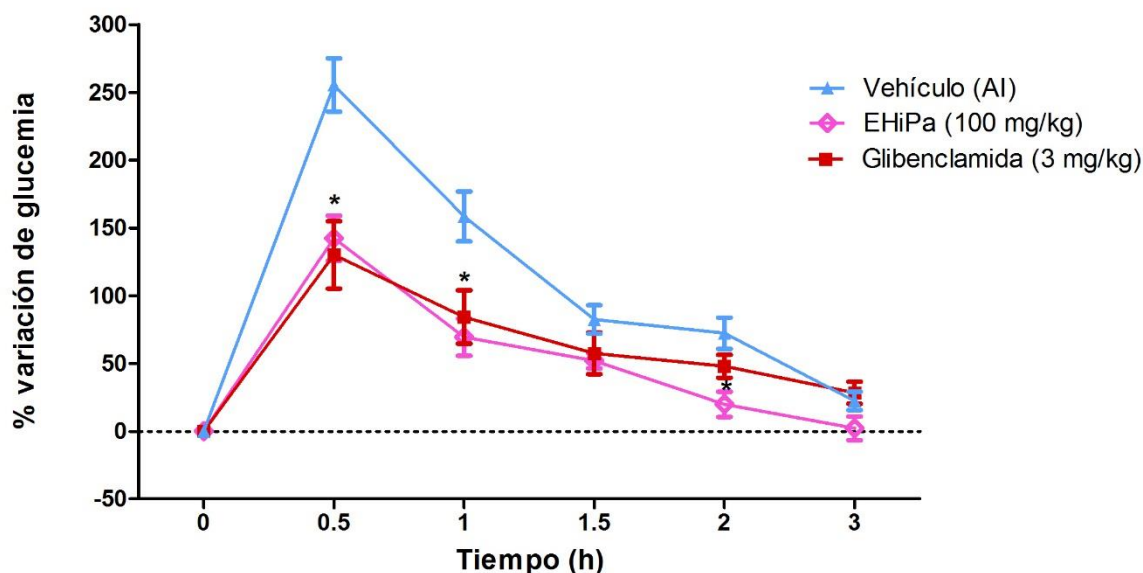
Este experimento es una de las evaluación más importante para determinar el posible efecto antidiabético en modelos DENID, ya que permite observar el metabolismo de glucosa (carga de 2 g/kg) a lo largo del tiempo (2 h) tras administrar los diferentes extractos de prueba (Ortiz-Andrade et al., 2007; Ortiz-Andrade et al., 2008). En este sentido, las CTG describen el potencial antihiper glucémico de las muestras de prueba, así como sugieren del nivel al que actúa un extracto o compuesto, dando indicios del nivel al que podría actuar una muestra de (Dinneen et al., 1992).



Grafica 1. Curva de tolerancia a la glucosa del extracto etanólico de *P. australis* (EEPa). Vehículo vs Extracto (* $p < 0.05$).



En la gráfica 1, correspondiente a la CTG del extracto etanólico de *Plantago australis* (EePa), se observa disminución significativa en la glucemia a los tiempos 0.5 y 1 horas, que puede ser resultado de pre-sensibilización de insulina, ya que el extracto se administró 30 min antes de la carga de glucosa (Chávez-Silva et al., 2018). Por otro lado, este patrón también puede deberse a la inhibición de los transportadores de glucosa presentes en el intestino (GLUT-2, SGLT-1) (Ortiz-Andrade, 2007). En estudios realizados con otras especies de *Plantago* como: *P. lanceolata*, *P. máxima*, *P. major* y *P. psyllium* también han mostrado disminución de la glucemia; sin embargo, no se ha descrito ningún mecanismo de acción antidiabético (Goncalves y Romano, 2016; Rodríguez-Morán, 1998).

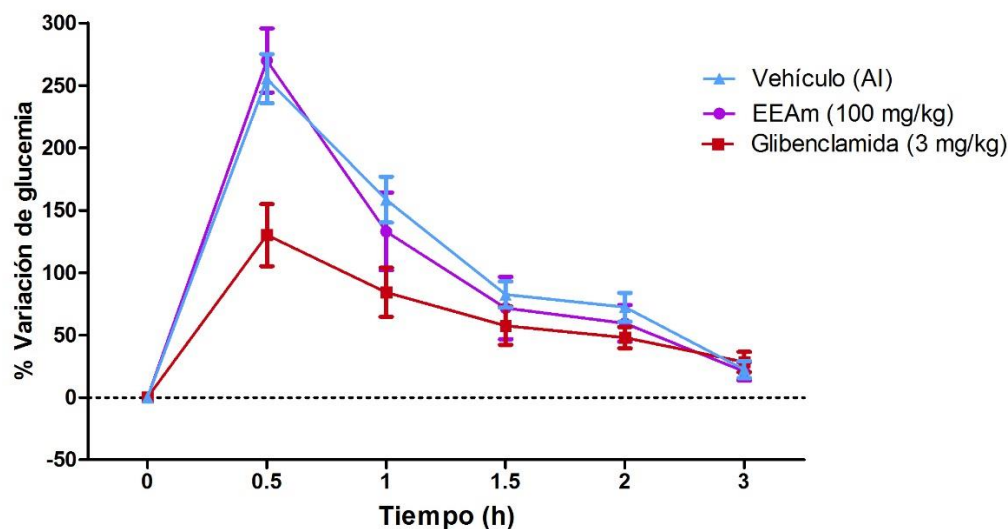


Gráfica 2. Curva de Tolerancia a la Glucosa del extracto hidroalcohólico de *P. australis* (EHiPa). Vehículo vs. Extracto (* $p < 0.05$)

Por otro lado, para el extracto hidroalcohólico de *P. australis* (EHiPa) también se observa (Gráfica 2) un patrón similar al de EePa, con disminución significativa de glucemia a 0.5, 1 y 2 horas después de administrar la carga de glucosa. Este efecto se puede atribuir a los mecanismos mencionados para el EePa: sensibilización de insulina y/o bloqueo de GLUT-2 y SGLT-1. Estos resultados sugieren que los compuestos responsables del efecto antihiper glucémico son polares dada la naturaleza de ambos extractos. En este sentido, diversos autores sugieren que algunos compuestos polares encontrados en esta familia podrían ser los responsables de este efecto, por ejemplo: flavonoides, ácidos fenólicos y polisacáridos (Goncalves y Romano, 2016; Rodríguez-Morán, 1998). Para esta



familia se han reportados compuestos menos polares (triterpenos), pero que también podrían ser responsables de esta actividad (Goncalves y Romano, 2016). Adicionalmente, algunos compuestos encontrados en la especie *P. major* como: luteolina 7-O-glucósido (Goncalves y Romano, 2016), ácido ursólico (Adom, et al., 2017; Guzmán-Ávila, et al., 2018), ácido oleanólico (Adom, et al., 2017; Ramírez-Espinosa, et al., 2011), tienen actividad antidiabética por lo que, de encontrarse en *P. australis* podrían ser los responsables de esta actividad. En este sentido Ramírez-Espinosa, et al., (2011) han propuesto que para algunos ácidos triterpénicos pentacíclicos como los ácidos ursólico y oleanólico y otros derivados, la inhibición de la (PTP-1B) tirosina fosfatasa 1-B (podría ser un mecanismo de acción antidiabético. La PTP-1B es un regulador negativo de la insulina, cuya principal acción es llevar a cabo la desfosforilación del receptor de insulina en los residuos de tirosina desactivándolo, de esta forma si algún compuesto actúa como inhibidor de PTP-1B, permitirá tener activado por más tiempo el receptor y por ende las acciones de la insulina (Ottanà et al., 2014). En este contexto resulta importante estudiar la inhibición de PTP-1B por los extractos de *P. australis* como potencial mecanismo de acción insulinosensibilizadora. Por otro lado, Seung-Hyung et al., (2013) encontraron que el ácido ursólico es un potencial agonista de PPAR γ e inhibe algunas interleucinas proinflamatorias, otros autores también han encontrado que algunos derivados sintéticos de ácido ursólico son ligandos de PPAR γ (Wang et al., 2000).

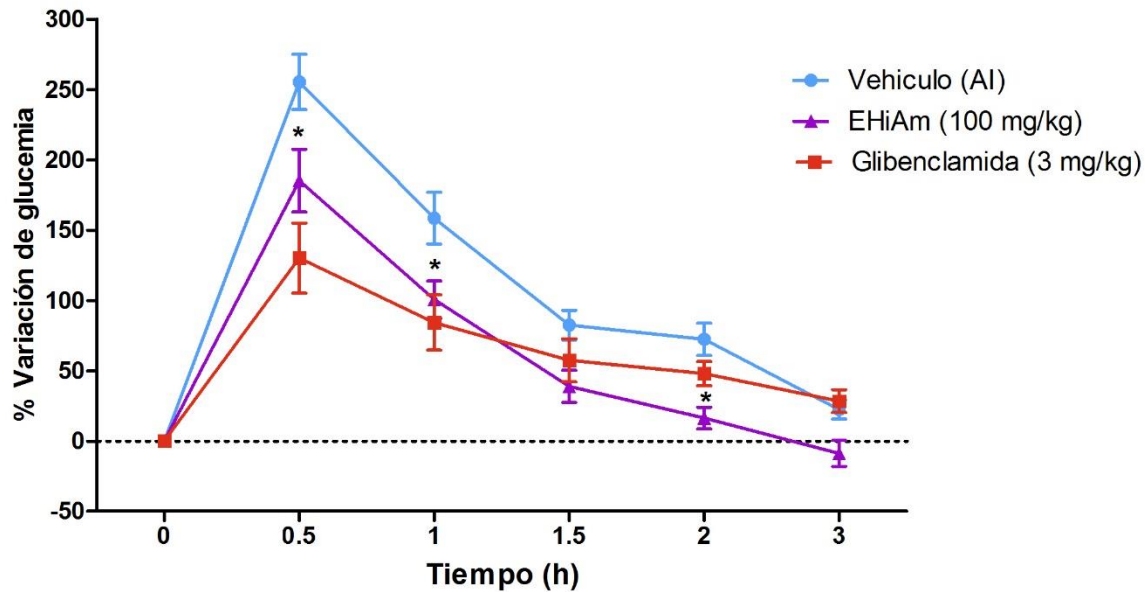


Gráfica 3. Curva de tolerancia a la glucosa del extracto etanólico de *Achillea millefolium* (EEAm).

Vehículo vs. Extracto ($p < 0.05$)



En la gráfica 3 correspondiente al extracto etanólico de *A. millefolium* no se observa disminución de la glucemia vs. el vehículo, debido a que quizá en este extracto no se obtuvieron compuestos con propiedades antihiperoglucémicas o bien la cantidad de compuestos no fue suficiente para ejercer algún efecto.



Gráfica 4. Curva de tolerancia a la glucosa del extracto hidroalcohólico de *A. millefolium* (EHiAm).

Vehículo vs. Extracto (* $p < 0.05$)

Sin embargo, pese a que el EEAm no mostró actividad significativa, en la gráfica 4 se aprecia que el extracto hidroalcohólico de *A. millefolium* disminuyó la glucemia a los tiempos 0.5 y 1 horas post-administración lo que permite sugerir que EHiAm podría actuar a nivel de la absorción intestinal de glucosa, que podría inhibir los co-transportadores de sodio-glucosa o los GLUT-2 (Ortiz-Andrade, 2007; Kellett et al., 2008). De igual manera hubo disminución significativa a las 2 h, asociada a un mecanismo de acción alterno, posiblemente a nivel de la sensibilización de la insulina (Ortiz-Andrade, 2007). Adicionalmente, hubo importante disminución del área bajo la curva vs. el vehículo y el grupo control (Glibenclamida). Por otro lado, posterior a las dos horas, hubo acción hipoglucemiante, ya que la glucemia fue menor de los valores basales establecidos, lo que sugiere un posible efecto secretagogo de insulina (Ortiz-Andrade, 2007), por lo que es importante hacer evaluaciones pertinentes para corroborarlo. Todo lo anterior nos hace



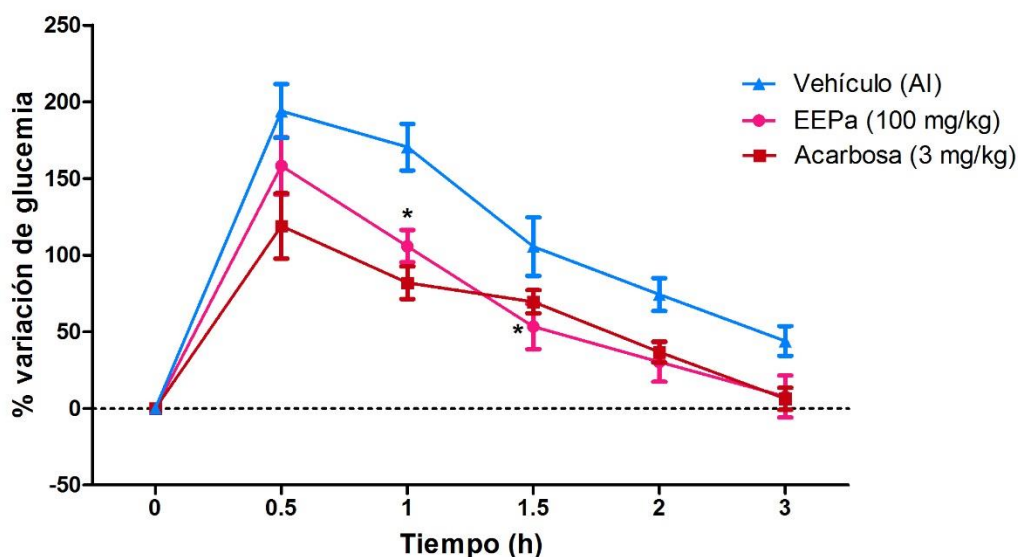
suponer que los compuestos responsables de la actividad antidiabética presentes en *A. millefolium* son de naturaleza polar.

7.1.2. Curvas de tolerancia a la sacarosa.

Por otra parte, para determinar la participación de mecanismos extrapancreáticos, como inhibición de las α -glucosidasas intestinales, se realizaron curvas de tolerancia a la sacarosa (CTS), usando como sustrato al disacárido sacarosa (2 g/kg).

Las α -glucosidasas son un consorcio enzimático localizado en las microvellosidades del intestino delgado, cuya principal función es hidrolizar los enlaces α -1,4 o α -1,2 de los disacáridos, y también se conocen como disacaridasas (Santa-Cruz y Zacarías-Castillo, 2002). Es importante recordar que para que absorban los monosacáridos (glucosa y fructosa), por sus distintos transportadores, es necesario que los polisacáridos y disacáridos sean hidrolizados (Bermúdez, et al., 2007). Es por ello que las α -glucosidasas han sido y siguen siendo un importante blanco terapéutico en el tratamiento de la DT2.

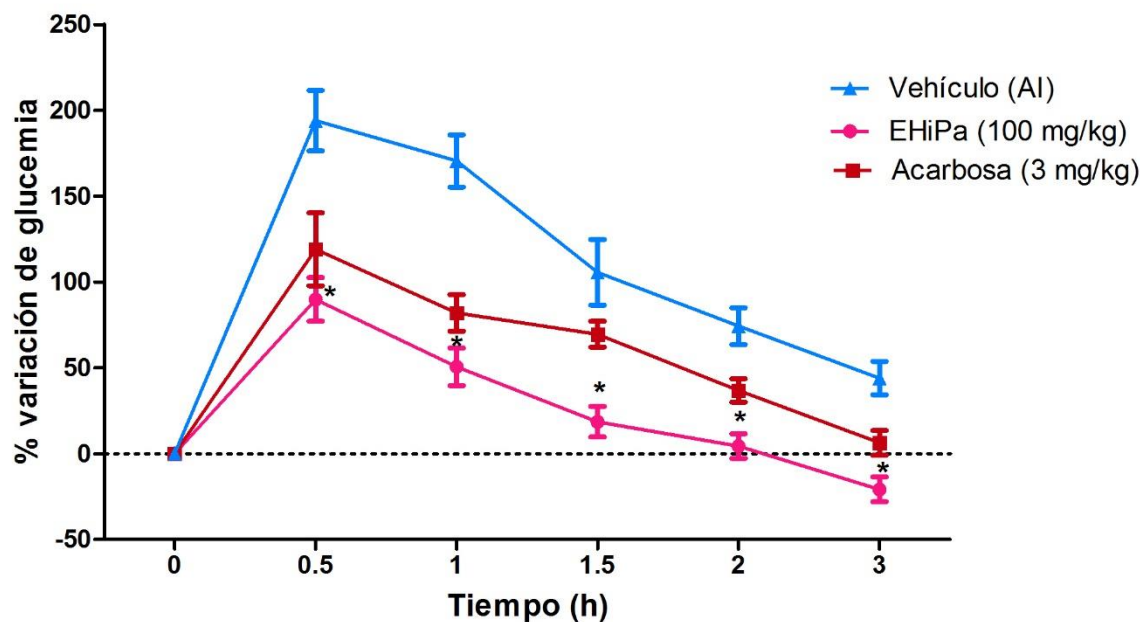
La inhibición reversible de estas enzimas impide la hidrólisis de poli y disacáridos de manera eficiente, lo cual contribuye a disminuir el pico hiperglucémico consecuencia de una menor y lenta absorción de los monosacáridos permitiendo mantener controlada la glucemia postprandial (Santa-Cruz y Zacarías-Castillo, 2002).



Gráfica 5. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto etanólico de *P. australis*.
Vehículo vs. Extracto (* $p < 0.05$)

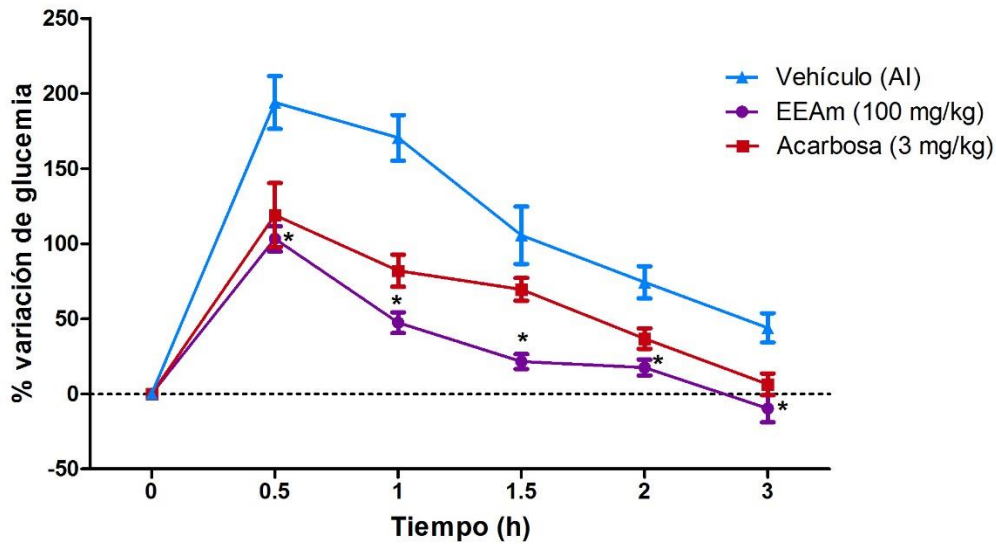


En la gráfica 5 hubo ligera disminución en el pico hiperglucémico correspondiente a EEPa a 0.5 horas, este patrón se incrementó a 1 y 1.5 horas, cuando hubo disminución significativa en el porcentaje de variación de glucosa. La disminución podría ser por inhibición parcial de las α -glucosidasas o bien por la participación de los mecanismos observados en la CTG.



Gráfica 6. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto hidroalcohólico de *P. australis*. Vehículo vs. Extracto (* $p < 0.05$)

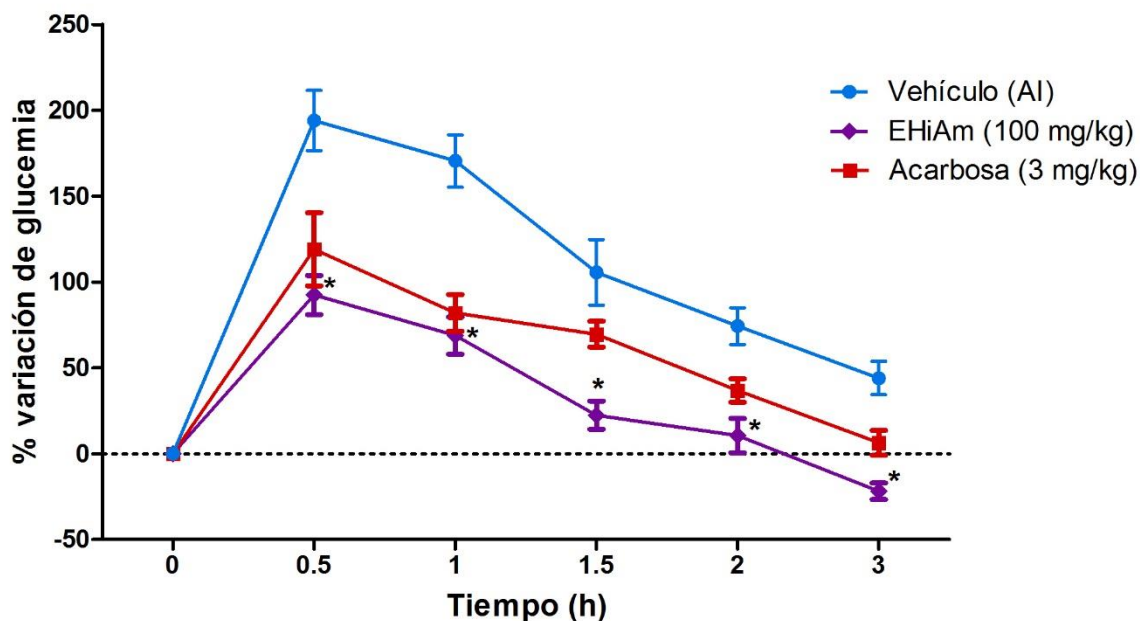
En la gráfica 6 se aprecia que el EHiPa disminuyó significativamente la glucemia en todos los tiempos, así como disminuyó el área bajo la curva vs. el vehículo y el control (acarbosa), y cuyo mecanismo de acción podría ser la inhibición de las α -glucosidasas. La inhibición de estas enzimas por EHiPa impide la hidrólisis de la sacarosa administrada, cuyo resultado es menor cantidad de glucosa disponible y retardo en su transporte, favoreciendo la disminución del pico hiperglucémico y mantenimiento de la glucosa postprandial (Chen, 2017). Adicionalmente, pueden participar los mecanismos observados en la CTG. Este mecanismo de acción se puede atribuir al tipo de compuestos encontrados en este extracto, ya que en muchos casos los compuestos de tipo polar, como flavonoides y compuestos glucosilados participan en la inhibición de las enzimas (Ramírez, et al., 2012).



Grafica 7. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto etanólico de *A. millefolium*. Vehículo vs. Extracto (* $p < 0.05$)

En las CTS del extracto etanólico (gráfica 7) e hidroalcohólico (gráfica 8) obtenidos de *A. millefolium* hubo disminución significativa en todos los tiempos vs. el vehículo, así como también hubo un patrón similar al del fármaco control (acarbosa), esto permite suponer que la inhibición de estas enzimas es un posible mecanismo antihiper glucémico para el EHiAm. Ramírez et al., (2012) reportaron inhibición del 50% de estas enzimas, *in vitro*, para un extracto hidroalcohólico de *A. millefolium* lo cual da sustento a lo observado en las CTS de este proyecto.

La inhibición de estas enzimas por los extractos etanólico e hidroalcohólico de *A. millefolium* disminuirá la cantidad de glucosa disponible proveniente de la hidrólisis de sacarosa, por lo que disminuye el pico hiper glucémico y la glucosa postprandial (Santa-Cruz y Zacarías-Castillo, 2002). Estos resultados nuevamente sugieren que los compuestos de carácter polar glucosilados o no, podrían ser los responsables de esta actividad (Ramírez et al., 2012).



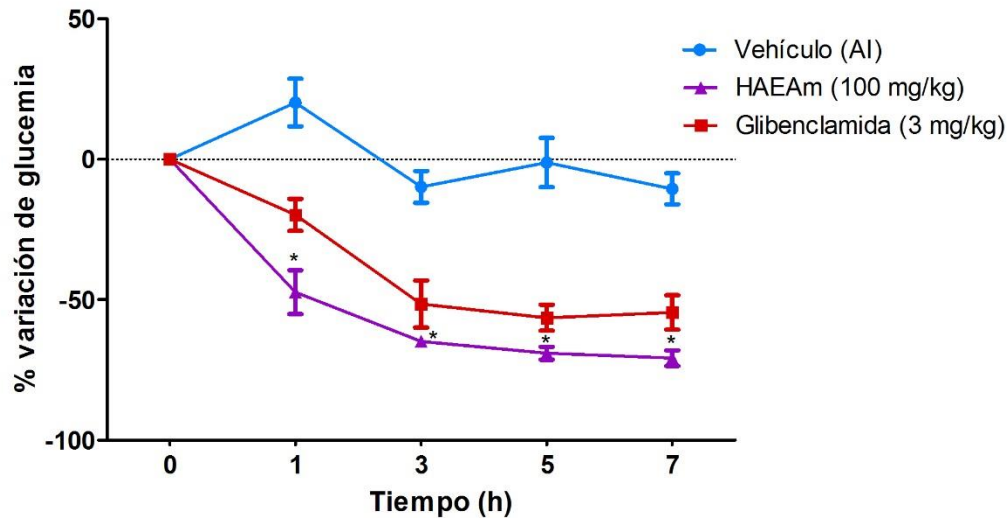
Grafica 8. Curva de Tolerancia a la Sacarosa del extracto hidroalcohólico de *A. millefolium*.

Vehículo vs. Extracto (*p<0.05)

Por otro lado, en la CTS del EHiAm se observa a la hora 3 la disminución significativa vs. el vehículo por debajo de los valores basales, presumiblemente como resultado de un efecto secretagogo (Chávez-Silva et al., 2018).

7.1.3. Ensayo antidiabético agudo.

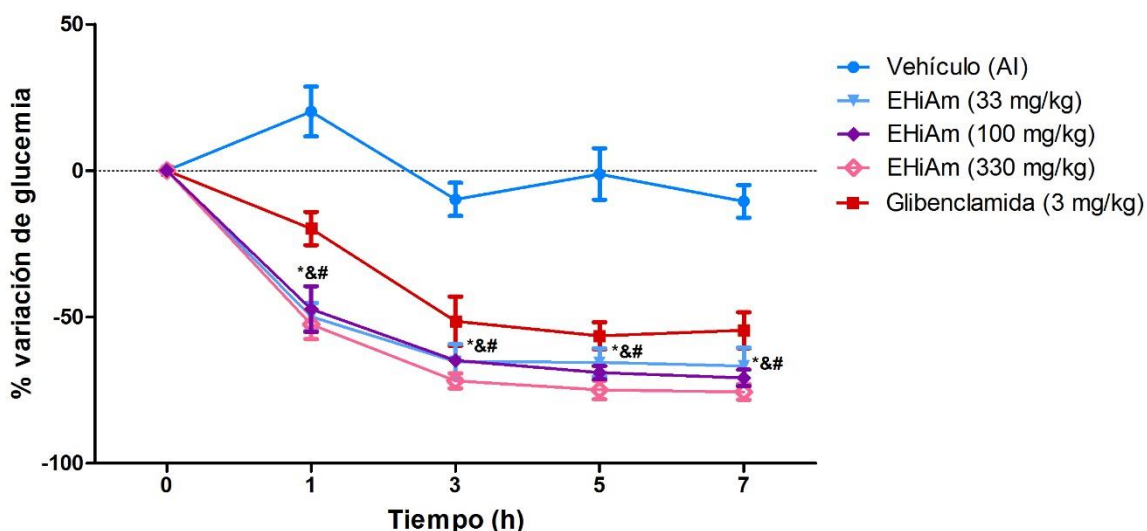
Con base en los resultados de los ensayos *in vitro* (expresión de RNAm de PPAR γ y GLUT-4, inhibición de α -glucosidasas, liberación de insulina y liberación de calcio), e *in vivo* (CTG y CTS), se eligió el extracto más activo (EHiAm) para observar su efecto agudo en un modelo de diabetes experimental no insulino dependiente.



Grafica 9. Ensayo antidiabético agudo del EHiAm.
Vehículo vs. Extracto (* $p < 0.05$)

En la gráfica 9, ensayo antidiabético agudo del EHiAm, se observa que el extracto disminuyó la glucemia de manera significativa vs. el vehículo. Resulta importante destacar que el extracto tuvo un efecto similar al control (glibenclamida), esta disminución puede ser resultado de los posible mecanismos antidiabéticos observados en las CTG con EHiAm, como son inhibición de α -glucosidasas, insulinosensibilización y el efecto insulinoscretagogo (Ortiz-Andrade et al., 2008; García-Díaz et al., 2016).

Además, como resultado del importante efecto observado con el EHiAm a 100 mg/kg se hicieron ensayos antidiabéticos con otras dosis del extracto (33 y 330 mg/kg), para observar si había dependencia de la dosis.



Grafica 10. Ensayo antidiabético agudo a distintas dosis del EHiAm.
Control vs. extracto (*,&,#p<0.05)

En la gráfica 10 se observa que el efecto del extracto a las dosis administradas es similar entre si y que las tres dosis (33, 100, 330 mg/kg) disminuyen de manera significativa la glucemia vs. el control (glibenclamida), lo que permite inferir que haya saturación de los sitios blanco, por lo que el efecto no se ve incrementado de manera importante a partir de 33 mg/kg.

7.2. Parte farmacológica: Evaluaciones *in vitro*.

Con base en los resultados de los ensayos *in vivo* se decidió hacer experimentos *in vitro* más específicos, que permitieran corroborar algunos de los mecanismos de acción observados *in vivo* explorando el potencial antihiper glucémico (inhibición de las α -glucosidasas), hipoglucemiantes (secreción de insulina y liberación de $[Ca^{2+}]_i$), e insulinosensibilización (expresión de PPAR γ y GLUT-4).

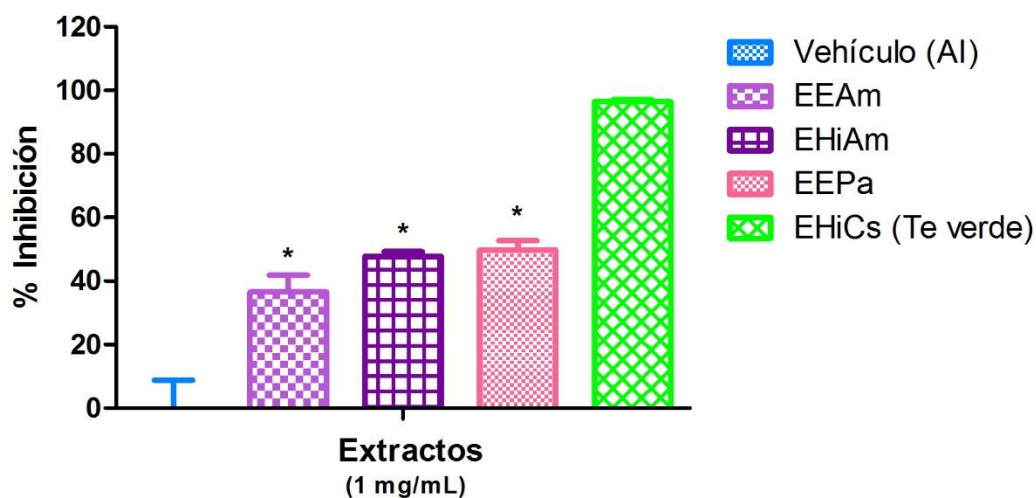
7.2.1. Evaluación de la inhibición de α -glucosidasas intestinales.

Con el fin de establecer y dar sustento al mecanismo inhibitorio de las α -glucosidasas observado con los extractos de *P. australis* y *A. millefolium* se hizo el ensayo de inhibición *in vitro* de esas enzimas.

La cantidad de glucosa absorbida tras la ingesta de alimentos está relacionada, de manera directa, con la actividad de las α -glucosidasas las cuales degradan a los polisacáridos (p.ej. almidón) y disacáridos (p.ej. sacarosa) a monosacáridos (glucosa) que estará disponibles para ser transportada. Entre más enzimas se encuentren activas habrá



más glucosa disponible para ser transportada incrementando la glucemia postprandial (Chen, 2017; Bermúdez et al., 2007); esta correlación es directamente proporcional, si las enzimas son inhibidas habrá menos glucosa disponible y disminuirá la glucosa postprandial.



Grafica 11. Inhibición de α -glucosidasas de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos.

* $p < 0.05$

Los resultados de los ensayos *in vitro* por inhibición de α -glucosidasas (gráfica 11), para los extractos EEPa, EEAm y EHiAm permiten observar 50% de inhibición.

Estos resultados son semejantes a lo observado en las CTS y dan sustento a que la inhibición de α -glucosidasas es uno de los mecanismos de acción antidiabéticos de *P. australis* y *A. millefolium*. Como se mencionó, la inhibición de estas enzimas retarda y disminuye la glucemia postprandial. El retardo en el transporte de glucosa permitirá tener mayor cantidad de insulina disponible al momento de la entrada de glucosa, favoreciendo así la translocación de GLUT-4 y permitiendo la entrada de glucosa a las células (Santa-Cruz y Zacarías-Castillo, 2002; Bermúdez et al., 2007).

Venditti et al. (2015) reportaron que el extracto hidroalcohólico de *Achillea tenorii* inhibe a las α -glucosidasas de *Saccharomyces cerevisiae* (CI_{50} 32.07 ± 2.2 $\mu\text{g/mL}$), aunque no se conoce al compuesto responsable de esta inhibición.

Estos resultados, en concordancia con los ensayos *in vivo*, sugieren que los compuestos polares como flavonoides y compuestos glicosilados podrían ser responsables de la actividad inhibitoria de las α -glucosidasas, como lo sugiere Dias et al., (2013); este tipo de



compuestos están presentes en los extractos metánolicos y acuosos y podrían ser responsables de esta actividad.

En este sentido, algunos autores han descrito que la luteolina, compuesto presente en *A. millefolium*, es inhibidor no competitivo de las α -glucosidasas (Yan et al., 2014; Al-Awwadi, 2013). Si bien no hay suficientes reportes sobre la composición química de *P. australis*, algunos autores indican que un constituyente de *P. major* es la luteolina 7-O-glucósido (Goncalves y Romano, 2016); esto nos hace pensar que este compuesto o alguno similar podría encontrarse en *P. australis*. Es por ello que este compuesto, así como otros flavonoides presentes en ambas especies podrían ser responsables de esta inhibición enzimática (Benedek et al., 2007a y 2007b).

7.2.2. Determinación de la expresión relativa de RNAm de PPAR γ y GLUT-4.

Con base en los resultados de CTG que sugieren mecanismos sensibilizadores a la acción de la insulina, se establecieron experimentos para determinar la expresión relativa de RNAm de PPAR γ y GLUT-4, ya que participan en la sensibilización de la insulina y adecuado transporte de glucosa, por lo que son un blanco terapéutico importante.

La expresión relativa de RNAm es un ensayo ampliamente empleado para conocer de manera indirecta si algún gen podría estar actuando como proteína (Morimoto y Yahara, 2018).

Los receptores activados por proliferador peroxisomal (PPAR) comprenden las isoformas PPAR α , PPAR γ y PPAR δ , que codifican para distintos genes que juegan un rol fundamentales en la regulación energética, proliferación y diferenciación celular (Berger y Moller, 2002).

Debido a su importante participación en el metabolismo de la glucosa y sensibilización de insulina, este proyecto se centra en el estudio de PPAR γ , expresados en tejido adiposo, músculo, hígado, y en menor grado en otras células (colon y macrófagos) (Clark, 2002). PPAR γ participa en la diferenciación de adipocitos y regula genes de proteínas que participan en el metabolismo de lípidos, entre ellas aP2, PEPCK, acil-CoA sintasa, y LPL; así como de FATP-1c y CD36 que están involucrados con la absorción de lípidos. Por otro lado, PPAR γ también regula genes del control de la energía celular incrementando a la proteína desacoplante mitocondrial (UCP) tipos 1, 2 y 3 (Berger y Moller, 2002).



Adicionalmente, los PPAR γ regulan genes que participan en la señalización de insulina, incrementando su transcripción, como la proteína asociada a c-CBL, sustrato receptor de insulina (IRS-2), piruvato deshidrogenasa cinasa (PDK4) y transportadores de glucosa tipos 1 y 4 (GLUT-1 y 4). Por otro lado, PPAR γ inhibe la transcripción de genes de NF- κ B, que regula la expresión de TNF- α e IL-6; por otra parte, también inhibe los genes de leptina y 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD1) (enzima altamente expresada en adipocitos y hepatocitos) responsable de convertir cortisona a cortisol, hormona que favorece la gluconeogénesis incrementando la glucemia en respuesta a estímulos de estrés. (Berger y Moller, 2002; Shepherd y Kahn, 1999; Wang, 2010).

Así, la activación de PPAR γ es un blanco novedoso importante que regula la transcripción de genes involucrados con la señalización de insulina y con el proceso inflamatorio de bajo grado.

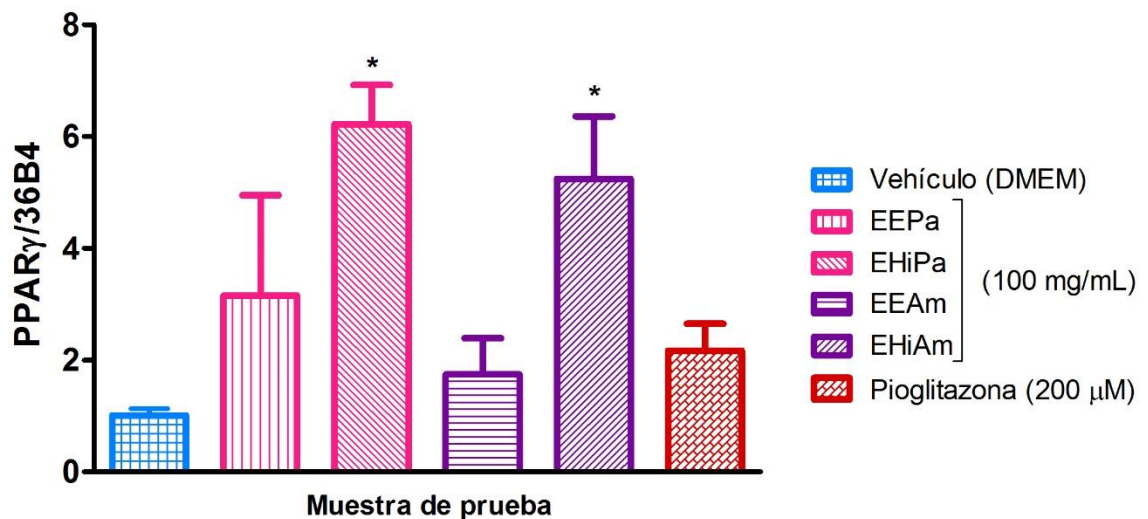
De manera natural los ligandos endógenos de PPAR son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como eicosanoides, ácidos grasos oxidados o nitrados y derivados de ácido linoleico. Sin embargo, se necesitan altas concentraciones (rango micromolar) de estos para activar a PPAR. PPAR γ tiene como ligandos naturales al ácido oleico, al linoleico, y al eicosapentanoico, algunos eicosanoides, endocannabinoides, derivados de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (oxLDL) como el ácido hidroxieicosatetraenoico (15-HETE) ácido 13-ceto-9Z,11E-octadecadienoico (13-oxo-ODE), ácido 9 y 13-hidroxi-octadecadienoico (9 y 13-HODE), ácido docosahexaenoico (DHA), derivado de prostaglandinas tipo 2 como 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) entre otros. Y como ligandos sintéticos, los derivados de tiazolidinedionas como rosglitazona y pioglitazona (Berger y Moller, 2002; Larsen et al., 2003).

Tras la unión del ligando a PPAR, este se unirá al ADN como heterodímeros obligado con su receptor nuclear de ácido 9-cis retinoico (RXR α , RXR δ o RXR γ), correspondiente y se unirá a su sitio de unión al ADN, conocido como elementos respuesta del receptor activado por proliferador (PPRE) que corresponde a una secuencia consenso de AGGTCA, separadas por un nucleótido motif DR-1 (Larsen et al., 2003) localizadas en la región promotor/potenciador del gen blanco. Esto desencadena un cambio conformacional que resulta en la liberación de co-represores, reclutamiento de co-activadores y subsecuente expresión del gen blanco (Yong-Xu, 2010). En este contexto, entre los genes expresados por activación de PPAR γ destaca el GLUT-4, de gran importancia en el tratamiento de la DT2 y de este proyecto.



La glucosa, al igual que el resto de monosacáridos, no difunde a través de la membrana, ya que necesita proteínas transportadoras. Existen dos grandes familias: los GLUTs y los co-transportadores de sodio y glucosa (SGLTs). Los GLUTs son más de 140 miembros (Bermúdez, et al., 2007).

GLUT-4 se encuentra de manera predominante en músculo y tejido adiposo, y su translocación depende de insulina (Shepherd y Kahn, 1999). En condiciones basales, GLUT-4 se localiza en vesículas citosólicas y tras la señalización por insulina estos se translocan a la membrana celular, permitiendo el transporte de glucosa a la célula (Bermúdez et al., 2007). Por consecuencia, si GLUT-4 no se transloca a la membrana, la glucosa no entra a la célula dando como resultado hiperglucemia. Es importante mencionar que la consecuencia principal de una inadecuada señalización de insulina o de resistencia a la insulina es baja o nula translocación de GLUT-4 (Shepherd y Kahn, 1999).

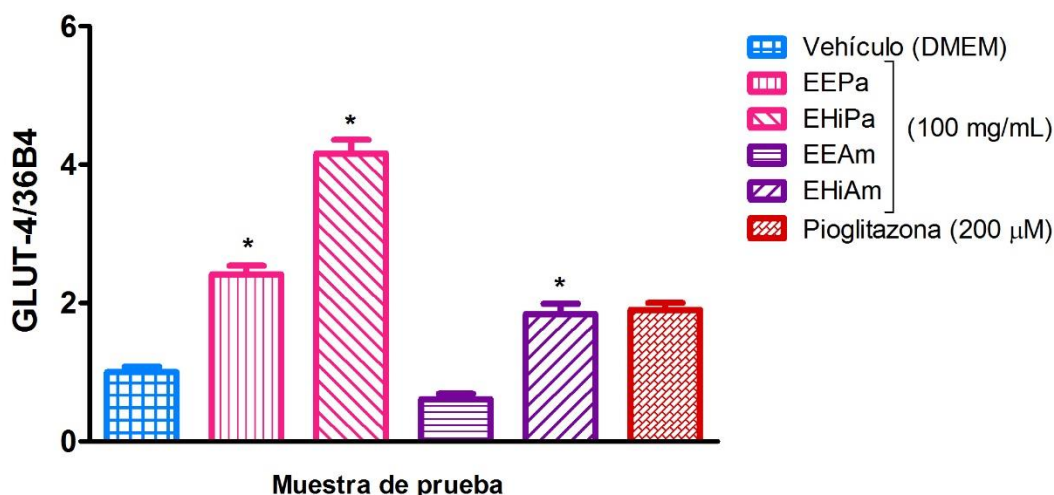


Gráfica 12. Determinación de la expresión de PPAR γ en células 3T3-L1.
Vehículo vs. extracto (* $p < 0.05$)

En la gráfica 12 se aprecia que los extractos hidroalcohólicos de *A. millefolium* y de *P. australis* incrementaron la expresión de mRNA de PPAR γ de manera significativa vs. el control. Este resultado sugiere un efecto insulinosensibilizador por ambos extractos, lo que correlaciona con los resultados *in vivo* de CTG, donde disminuyó la glucemia a la hora 2, lo que se asocia con mecanismos insulinosensibilizadores (Chávez-Silva et al., 2018). Adicionalmente, estos extractos incrementaron la expresión del mRNA de PPAR γ vs. pioglitazona (cuyo mecanismo incrementa la expresión de PPAR γ e

insulinosenibilización) (Larsen et al., 2003; Yong et al., 2010; Hidalgo-Figueroa et al., 2013; Almanza-Pérez et al., 2010).

Zolghadri et al. (2014) reportaron que el extracto etanólico de *A. millefolium* disminuye significativamente la expresión de los genes de IL-1 β e iNOS en un modelo de ratas diabéticas inducido con por STZ. Además, de Moura-Sperotto et al. (2018) reportaron que el derivado fenólico verbascósido, encontrado en *P. australis*, disminuye las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 β , así como la vía de NF- κ B en el modelo de la inflamación inducida por LPS. Esos hallazgos podrían relacionarse con PPAR γ , ya que su activación disminuye la expresión de genes de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-12) (Clark, 2002). Siendo la disminución o inhibición de la respuesta inflamatoria de bajo grado un mecanismo para mejora la sensibilización a la insulina.



Gráfica 13. Expresión de GLUT-4 en células 3T3-L1.
 Vehículo vs. extracto (* $p < 0.05$)

En la gráfica 13 observamos que los extractos EHiAm y EHiPa incrementan la expresión del mRNA de GLUT-4, en paralelo con la expresión de PPAR γ , cuyo efecto es favorecer la expresión y translocación de este transportador (Larsen et al. 2003; Yong-Xu, 2010; Hidalgo-Figueroa et al., 2013). Algunos estudios sugieren que activar PPAR γ promueve la absorción de glucosa en músculo (Yong-Xu, 2010), lo que se asocia con la expresión y función de GLUT-4. Esos resultados concuerdan con los de expresión de PPAR γ y con los ensayos *in vivo*, y sugieren que la activación de PPAR γ podría ser un mecanismo de acción de EHiAm y EHiPa ya que al promover la expresión de GLUT-4 se favorece el transporte de glucosa lo que disminuye su concentración en sangre.



En estudios actuales de nuestro grupo, Arias-Durán (datos no publicados de tesis doctoral) demostró que en aorta de rata *ex vivo* el extracto hexánico de *A. millefolium* favorece de manera significativa la vasorrelajación siendo el bloqueo de canales de calcio tipo L el principal mecanismo de acción y donde el óxido nítrico (NO) participa en menor medida; en este sentido algunos autores han sugerido que al activar PPAR γ disminuye la presión arterial y esto está asociado con el bloqueo de canales de calcio tipo L y por producción de NO (Rodríguez-Pérez et al., 2007). Esto sustenta que la activación de PPAR γ es un mecanismo del EHiAm.

7.2.3. Secreción de Insulina y liberación de calcio intracelular.

Para corroborar si EHiAm es secretagogo de insulina, de acuerdo a lo observado en las CTG y CTS, por disminución de glucemia a lo largo de 3 horas efecto característico de fármacos con este mecanismo de acción como las sulfonilureas, se planteó determinar la liberación de insulina y cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ en células provenientes de insulinoma de rata (RINm5F).

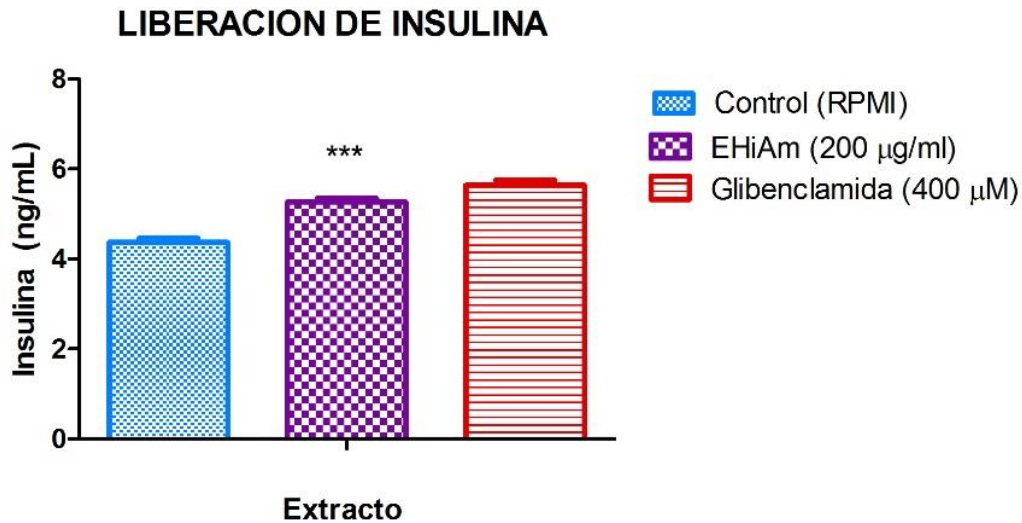
La liberación de insulina es el mecanismo hipoglucemiante de uno fármacos de primera elección en el tratamiento de la DT2 (glibenclamida). Este promueve la liberación de insulina independiente de glucosa y actúa en cuestión de minutos. El mecanismo de acción de este fármaco se lleva a cabo mediante el bloqueo de canales de K⁺ dependientes de ATP, de esta forma, el K⁺ se acumula en el interior de la célula y conduce a despolarización de la membrana con lo que se abren canales de calcio y aumenta $[Ca^{2+}]_i$ (García, 1995). Esto activa a la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza fosfatidilinositol bisfosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), que participan en la movilización intracelular de Ca²⁺. Finalmente, esto activa al sistema de microtúbulos y microfilamentos encargados de la exocitosis de los gránulos de insulina (Espejel-Nava, 2014). Con la liberación de insulina y su unión al receptor se desencadenan distintas cascadas de señalización implicadas en efectos mitogénicos y metabólicos, siendo estos últimos de relevancia en el tratamiento de la DT2 y en este proyecto.

La disponibilidad y la importancia del Ca²⁺ en la liberación de insulina, es que el ión regula eventos como: la exocitosis de insulina mediada por segundos mensajeros dependientes de Ca²⁺, donde la PLC, hidroliza al PIP₂ en DAG e IP₃; el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) que se activa por $[Ca^{2+}]_i$ e induce la exocitosis de la insulina; el IP₃ se une al



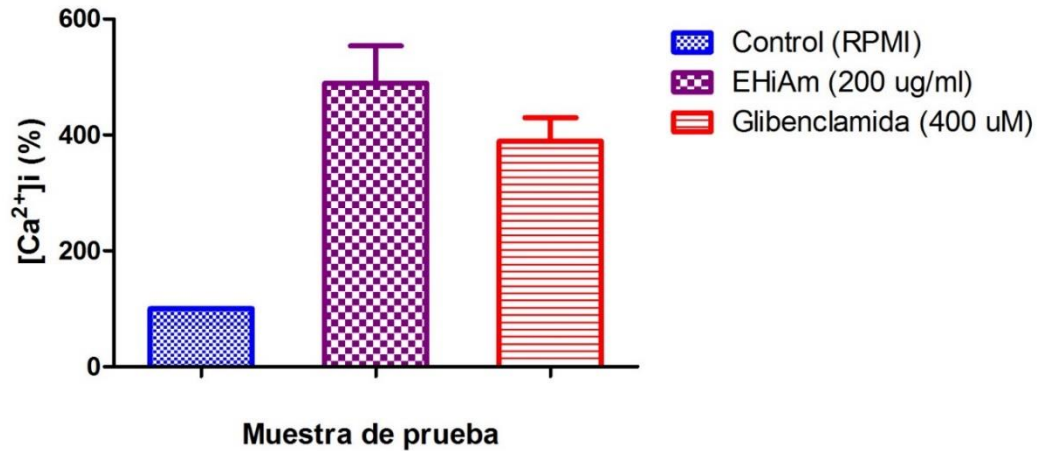
receptor inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃R), canal de Ca²⁺ intracelular sensible a IP₃, en el retículo endoplásmico para liberar más Ca²⁺ al citoplasma.

En la gráfica 14 se observa la liberación de insulina por EHiAm, donde el extracto promovió de manera significativa la liberación de insulina vs. el vehículo con un patrón similar al fármaco glibenclamida que tiene como efecto farmacológico la liberación de insulina.



Grafica 14. Liberación de insulina en células RINm5F.
Vehículo vs. extracto (* $p < 0.05$)

La insulina se sintetiza y se secreta en respuesta a varios estímulos (aminoácidos, neurotransmisores, hormonas y glucosa) (Joshi et al., 2007). La glucosa es el estímulo fisiológico más importante. La glucosa desencadena eventos que involucran el cierre de canales de K⁺ sensibles a ATP, seguidos de aumento en [Ca²⁺]_i citosólico, fundamental para la secreción de insulina (Miranda-Pérez et al., 2016; Guillausseau et al., 2008).



Grafica 15. Liberación de $[Ca^{2+}]_i$ en células RINm5F. Vehículo vs. extracto (* $p < 0.05$)

En la gráfica 14, las células tratadas con EHiAm (200 $\mu\text{g/mL}$) aumentaron la secreción de insulina (5.3 ng/mL) vs. el control (4.4 ng/mL), de manera similar a la glibenclamida (400 μM). Además, en la gráfica 15 y en la figura 31 se muestra que las células tratadas con EHiAm aumentaron el $[Ca^{2+}]_i$ (4.9 veces) en comparación con el control, y fue similar a la glibenclamida.

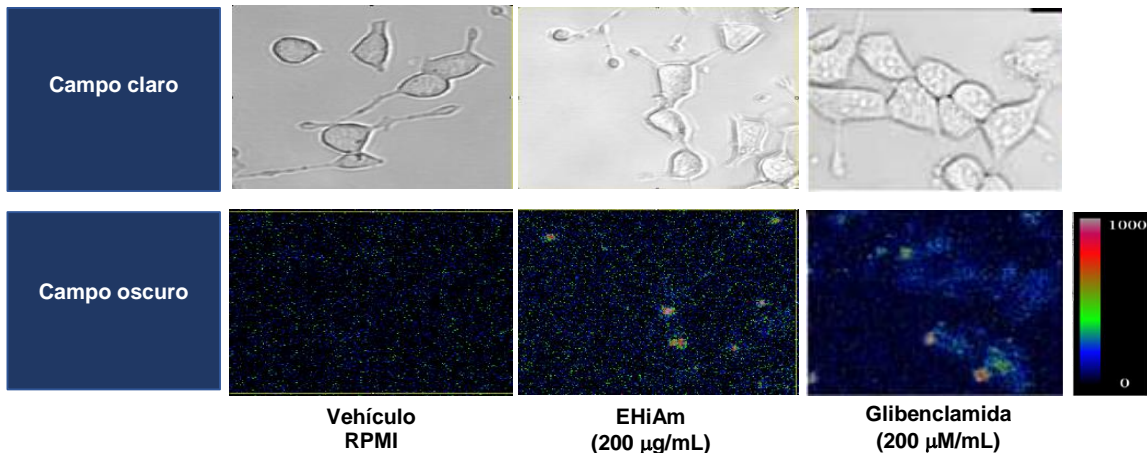


Figura 31. Efecto del EHiAm en liberación de $[Ca^{2+}]_i$ en las células RINm5F. Células vistas en campo claro y oscuro. La escala vertical indica el incremento en la fluorescencia.

Varios reportes muestran que los extractos polares (metanólico, hidroalcohólico y acuoso) de *A. millefolium* protegen contra los efectos deletéreos de alloxano y STZ en la célula β (Zolghadri et al., 2014; Mustafa et al., 2012), y Zolghadri et al. (2014) asociaron ese efecto con hiperinsulinemia e hipoglucemia en ratas STZ-diabéticas. Otras investigaciones han



mostrado que *A. santolina* disminuye el daño oxidativo del tejido pancreático, y restaura la insulina en plasma (Yazdanparast et al., 2007). Estos resultados permiten relacionar la secreción de insulina, cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ citosólico, y la hipoglucemia observados *in vivo*, y que el aumento de calcio participa en la secreción de insulina y este es un modo de acción del efecto antidiabético de EHiAm. Sin embargo, son necesarios más experimentos para esclarecer el mecanismo implicado en la liberación de insulina.

7.3. Parte toxicológica.

El objetivo de las evaluaciones toxicológicas es predecir o determinar los posibles efectos adversos que se pueden presentar en los humanos tras estar expuestos a sustancias químicas de forma aguda y/o crónica (Meyer, 2003). Es por esto que en este proyecto se plantearon experimentos de toxicidad aguda y subcrónica del EHiAm ya que fue el extracto más activo.

Por otro lado, resulta ser de suma importancia realizar estudios de toxicidad con el fin de establecer su seguridad, puesto que se tiene la falsa creencia que lo natural no es tóxico o no genera reacciones adversas, sin embargo los estudios científicos confirman que las plantas también pueden presentar estos efectos (Athmouni et al., 2018).

7.3.1. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda se define como: los cambios adversos que ocurren de inmediato o en periodo corto de tiempo tras la administración y corta exposición de una o múltiples dosis en un periodo no mayor a 24 horas de una sustancia química. En este sentido un efecto adverso es resultado de disfunción y/o alteración bioquímica que afecta al adecuado funcionamiento del organismo y que podría incidir en letalidad por la entidad química.

Para evaluar el posible efecto toxicológico tras administrar una sola dosis del EHiAm se determinó la toxicidad aguda, acorde con el apartado 423 de la OCDE, el informa el rango de DL_{50} de la muestra de prueba, y permite clasificar a la muestra de prueba de acuerdo al sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) (Schlede et al. 2005).

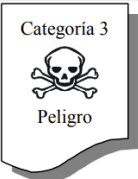
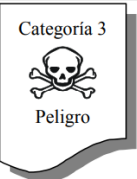
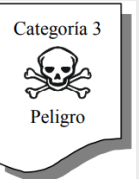
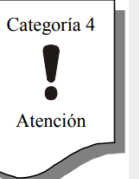
El SGA tiene como uno de sus propósitos mejorar la protección de la salud humana y del medio ambiente al facilitar un sistema homogéneo con una base común y coherente de clasificación, para comunicar los peligros de una sustancia. Así, la clasificación se refiere



a los peligros derivados de las propiedades intrínsecas de sustancias y mezclas, ya sean naturales o sintéticas (SGA, 2011).

De acuerdo a la SGA (2011) las sustancias se clasifican en cinco categorías de toxicidad, basadas en la toxicidad aguda por ingestión, absorción cutánea o inhalación. Los valores de toxicidad aguda se expresan en valores aproximados de DL₅₀ o CL₅₀ o en estimaciones de la toxicidad aguda (ETA).

Tabla 4. Categorías de peligro de toxicidad aguda por ingestión y elementos que deben figurar en la etiqueta (modificado de SGA, 2011).

Ingestión (mg/kg)	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5
Rango de valores experimentales de toxicidad aguda	0 ≤ 5	5 ≤ 50	50 ≤ 300	300 ≤ 2000	2000 ≤ 5000
Estimación puntual obtenida de toxicidad aguda	0.5	5	100	500	2500
Símbolo					Sin símbolo
Palabra de advertencia	Peligro	Peligro	Peligro	Atención	Atención
Indicación de peligro	<i>Mortal en caso de ingestión</i>	<i>Mortal en caso de ingestión</i>	<i>Toxico en caso de ingestión</i>	<i>Nocivo en caso de ingestión</i>	<i>Puede ser nocivo en caso de ingestión</i>

En la Tabla 4 se presentan resultados de mortalidad de cada una de las dosis evaluadas del EHiAm, establecidas en el apartado 425 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE).

Así, el EHiAm se clasifica en la categoría 4, correspondiente a sustancia nocivas, dado que a la dosis más alta evaluada (2,000 mg/kg) no hubo mortalidad (OCDE, 2011). Adicionalmente, los ratones tratados con cada dosis no tuvieron cambios físicos ni conductuales aparentes.

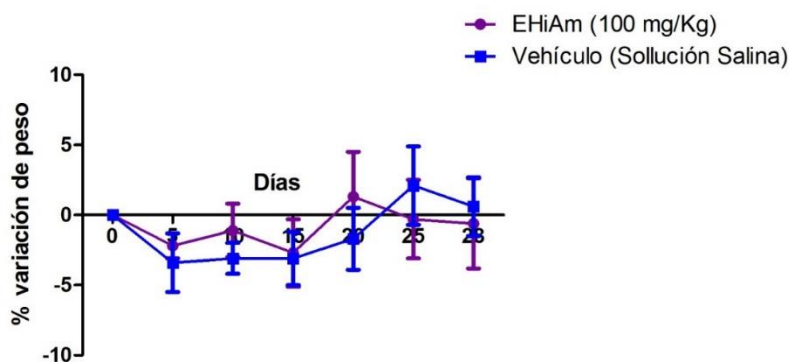


Tabla 5. Ensayo de toxicidad aguda

Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Clasificación (SGA)	Símbolo
5	0	Categoría 4 "Sustancia Nociva"	
50	0		
300	0		
2000	0		

7.3.2. Toxicidad sub-crónica.

El uso de cualquier planta con fines medicinales no garantiza su seguridad o bien que esta solo tenga efectos terapéuticos (Yuet et al., 2013). Los ensayos de toxicidad sub-crónica informan acerca del efecto tras administrar un xenobiótico con la misma dosis por tiempo prolongado (28 días). Para tal efecto se evaluó la histología de hígado, riñón y corazón, así como los parámetros bioquímicos relacionados con daño en la función hepática y cardíaca (ASL y ALT), ya que estos órganos pueden afectarse ↓ por tratamiento a mediano y largo plazos (Moreira et al., 2014).



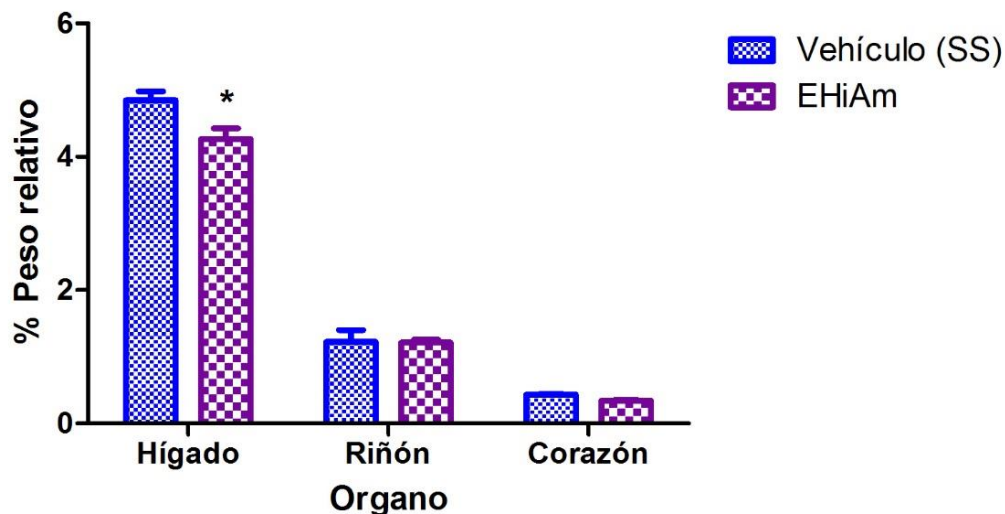
Grafica 16. Variación de peso de los ratones tratados con EHiAm con respecto al grupo vehículo durante 28 días de tratamiento.

EHiAm vs. Vehículo ($p < 0.05$)

La gráfica 16 muestra la variación de peso de ratones tratados con EHiAm vs. el grupo control (vehículo), se observa que no hay variación de peso entre ambos grupos, y durante los 28 días del ensayo no hubo cambios en conducta y locomoción entre grupos. Esto sugiere que no hay algún proceso tóxico o de daño aparente, ya que el aumento o la disminución del peso corporal puede indicar cambios fisiológicos importantes, que bien



podrían estar relacionados con el daño de algunos órganos, inadecuado funcionamiento hormonal, o incapacidad de absorber nutrientes, entre otros (Antonelli-Ushirobira et al., 2010).



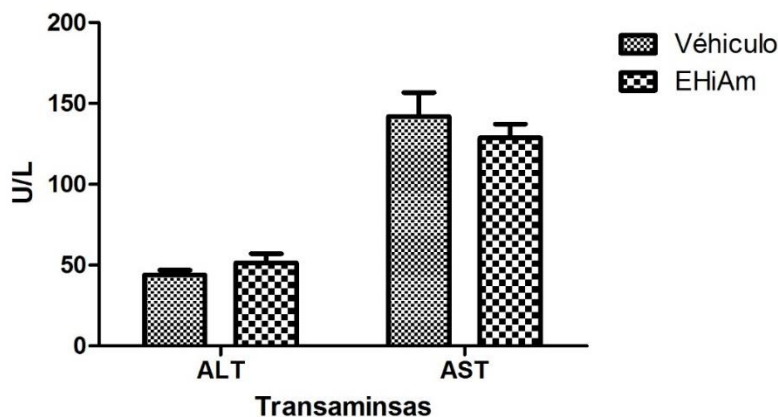
Grafica 17. Variación de peso relativo de los principales órganos metabolizadores tras 28 días de tratamiento.

La variación de peso de los órganos internos es un índice de posible toxicidad tras la exposición prolongada a un xenobiotico (Rosidah et al., 2009). Por lo que en este proyecto se determinó la variación de peso de los principales órganos involucrados en el metabolismo y eliminación de xenobióticos (Gráfica 17), encontrando que no hubo cambios en el peso del corazón y riñón de ratones tratados con EHiAm ni con vehículo. Sin embargo, hubo disminución significativa del hígado vs. el vehículo, dato que concuerda con los estudios de Cavalcanti et al. (2006), donde el extracto acuoso de *A. millefolium* disminuyó el peso del hígado de ratas hembra y macho después de 28 y 90 días de tratamiento, sin que la disminución se asocie con efectos tóxicos aparentes. Adicionalmente, la disminución en el peso del hígado de los animales tratados podría ser un posible efecto hepatoprotector del EHiAm, ya que en estudios realizados por Gagdoli y Mishra (1995), *A. millefolium* protegió al hígado del daño por tetracloruro de carbono y paracetamol.

El hígado es el principal órgano encargado de llevar a cabo la detoxificación del organismo por metabolismo de xenobioticos (Adeneye et al., 2006). Así, para determinar y corroborar que EHiAm no estaba generando daño o alteraciones hepáticas tras la exposición prolongada, se evaluó la actividad de alanino aminotransferasa (ALT) y



aspartato aminotransferasa (AST), las cuales suelen ser un buen marcador de daño hepático (Fan et al., 2018). Estas enzimas están en células hepáticas y cuando daño hepático salen al torrente sanguíneo elevando sus valores plasmáticos (Athmouni et al., 2018).



Grafica 18. Valores de transaminasas (ALT y AST) después de 28 días de tratamiento.

Los valores transaminasas (gráfica 18) no tuvieron cambios significativos vs. el vehículo y están en los parámetros normales para ratón, y aunque hubo disminución del peso relativo del hígado no hubo daño en este órgano. Además, estos resultados son similares a los reportados por Cavalcanti et al. (2006) para el extracto acuso de *A. millefolium*.

Finalmente, para determinar que no hubo daño celular en los órganos mencionados, se realizó la histología con distintas tinciones lo que sugiere que EHiAm (100 mg/kg) durante el tiempo administrado (28 días) no causa toxicidad aparente.

El hígado es responsable del metabolismo de xenobióticos vía citocromo P450, y está expuesto a daño por la generación de metabolitos tóxicos (Alvarado-Rico y Castro, 2010). Estos metabolitos tóxicos pueden dañar a otros órganos como el riñón, principal órgano involucrado en eliminar fármacos y otras sustancias (Jorge y Jorge, 2005).

Las micrográficas (figura 32) muestran la integridad celular con núcleos definidos, membranas normales. No hay infiltración celular, ni datos de procesos necróticos en los órganos observados (corazón, riñón e hígado).

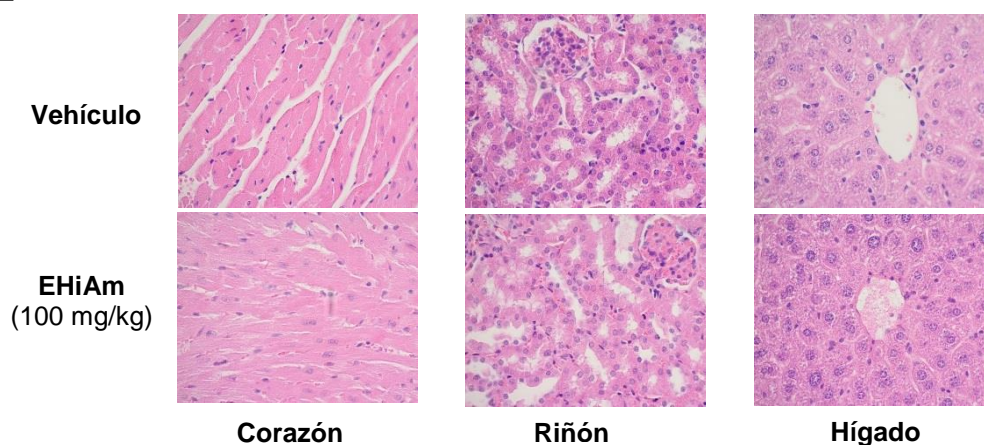


Figura 32. Micrografías de los principales órganos metabolizadores con tinción de hematoxilina-eosina.

7.4. Parte Química.

A partir del material vegetal seco y molido de *A. millefolium* (350 g) y *P. australis* (200 g) se obtuvieron los extractos etanólico. También se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos de *A. millefolium* (500 g) y *P. australis* (100 g), las cantidades y rendimientos obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos de los extractos obtenidos.

Planta	Extracto	Cantidad de extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
<i>Achillea millefolium</i>	Etanólico (EEAm)	10.3	2.9
	Hidroalcohólico (EHiAm)	9.2	1.8
<i>Plantago australis</i>	Etanólico (EEP _a)	5.6	2.8
	Hidroalcohólico (EHiP _a)	3.5	3.5

7.4.1. Perfil fitoquímico preliminar.

Con base en los resultados *in vivo* se eligió al EHiAm para la fitoquímica preliminar y conocer alguno de los compuestos responsables de la actividad antidiabética. Se partió de 10 g de EHiAm seco, el cual tras haberse sometido al proceso de extracción con acetato de etilo y obtenerse seco (4 g), se fraccionó por cromatografía en columna abierta utilizando como fase estacionaria gel de sílice con tamaño de partícula: 0.063-0.200 mm (Merck), y como fase móvil se utilizaron distintos disolventes en orden creciente



de polaridad. Se obtuvieron 373 fracciones que se agruparon por similitud cromatográfica en 11 fracciones (Tabla 7).

Tabla 7. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna abierta.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
Hexano: acetato de etilo	90:10	1-23	Am-A	0.161
	80:20	23-35	Am-B	0.085
		46-63	Am-C	0.558
		64-148	Am-D	0.296
		151-217	Am-E	0.153
	70:30	218-250	Am-F	0.212
251-270		Am-G	0.180	
60:40	271-290	Am-H	0.151	
Acetato de etilo	100	300-330	Am-I	0.072
		331-340	Am-J	0.081
Metanol	100	341-373	Am-K	0.951

El fraccionamiento se monitoreó con lámpara de U.V. y en las fracciones **Am-C** y **Am-E** se encontraron compuestos aparentemente puros, y la fracción **Am-D** tenía la mezcla de los compuestos encontrados en **Am-C** y **Am-E**. Así, se eligieron las fracciones **Am-C** y **Am-E** para la caracterización correspondiente (Figura 33).

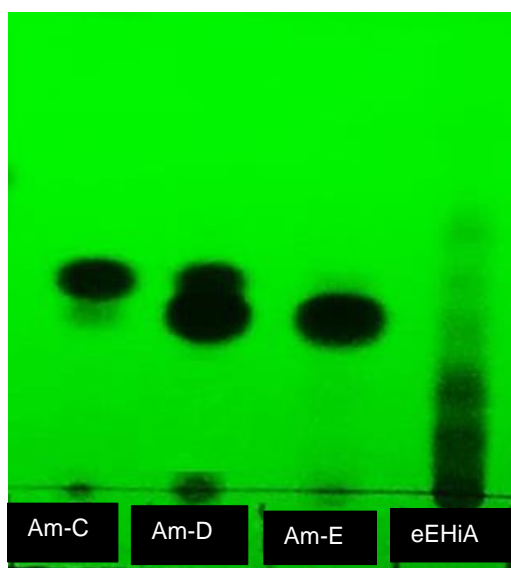


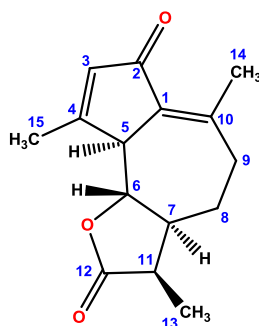
Figura 33. Cromatografía en placa fina de las fracciones Am-C, Am-D, Am-E y de la fase orgánica de la extracción del EHiAm (eEHiAm).



La fracción **Am-C** se obtuvo como un polvo blanco amarillento cuyo punto de fusión es 203-207 °C y está en un rango característico de sustancias puras y corresponde al reportado en la literatura (Arias-Durán, 2018). Adicionalmente, este compuesto se caracterizó por RMN¹H y RMN¹³C. Las señales fueron asignadas por similitud con las reportadas por nuestro grupo de trabajo (Arias-Durán, 2018) para la lactona sesquiterpénica leucodina (Tabla 12).

Tabla 8. Desplazamientos químicos obtenidos y reportados para leucodina.

(400 MHz, CDCl₃)



Carbono	δ (ppm) reportados por Arias-Duran, 2018	δ (ppm) obtenidos	Protón	δ (ppm) reportados por Arias-Duran, 2018	δ (ppm) obtenidos
C1	131.8	131.9	---	---	---
C2	195.9	195.9	---	---	---
C3	135.5	135.5	H3	6.16	6.16
C4	169.9	169.9	---	---	---
C5	52.5	52.5	H5	3.37-3.46	3.37-3.46
C6	84.1	84.1	H6	3.62	3.62
C7	56.3	56.3	H7	2.00-2.07	2.00-2.07
C8	25.9	25.9	H8	1.28-1.43	1.28-1.43
C9	37.5	37.5	H9	2.31-2.39	2.31-2.39
C10	152.1	152.0	---	---	---
C11	41.1	41.1	H11	2.19-2.27	2.19-2.27
C12	177.5	177.5	---	---	---
C13	12.2	12.2	H13	1.25-1.28	1.25-1.28
C14	21.6	21.6	H14	2.43-2.44	2.43-2.44
C15	19.8	19.8	H15	2.29-2.31	2.29-2.31

8. CONCLUSIONES.

El EHiPa disminuyó la glucemia en las CTG y CTS y los mecanismos de acción son la insulinosensibilización (ya que incrementa la expresión del mRNA de PPAR γ y GLUT-4) y la inhibición de las α -glucosidasas.

El EHiAm tiene mecanismo de acción 'multitarget': inhibe las α -glucosidasas (antihiper glucémico), incrementa la expresión del mRNA de PPAR γ y GLUT-4 (insulinosensibilizador), y promueve la secreción de insulina y liberación de calcio intracelular (insulinosecretagogo), lo que resulta en hipoglucemia en los ensayos *in vivo* (figura 34).

Los ensayos de toxicidad aguda y subcrónica sugieren que el EHiAm no causa toxicidad aparente ni mortalidad a dosis menores a 2 000 mg/Kg, siendo buen candidato para el desarrollo de un fitomedicamento y para la búsqueda de compuestos bioactivos.

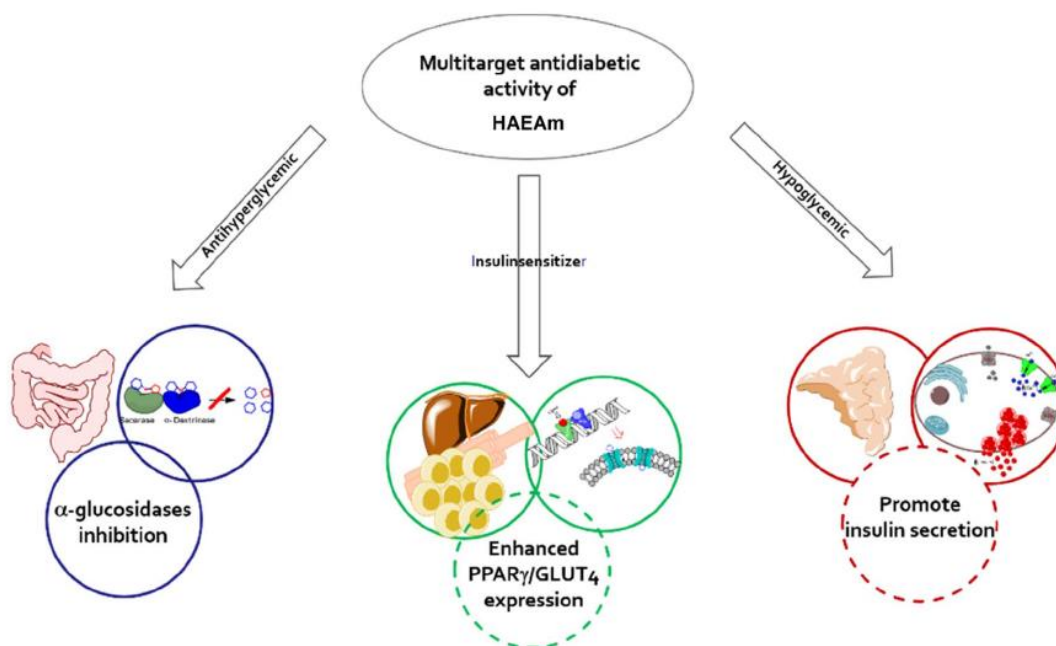


Figura 34. Mecanismos de acción involucrados en el efecto antidiabético de *A. millefolium*

9. PERSPECTIVAS.

- ✓ Determinar el mecanismo de acción secretagogo de insulina del EHiAm y de las moléculas responsables de este mecanismo de acción.
- ✓ Determinar el perfil fitoquímico.
- ✓ Determinar el potencial efecto antidiabético sub-agudo del EHiAm en un modelo de diabetes inducido con dieta de cafetería.

10. REFERENCIAS

- Acosta-García E., **2012**. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. Acta Bioquím Clín Latinoam. 46. 183-94
- Adeneye A. A., Ajagbonna O.P., Adeleke T.I., Bell S.O., **2006**. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 105. 374–37
- Adom M. B, Taher M, Mutalabisin MF, Amri MS, Abdul Kudos MB, Wan Sulaiman MWA, Sengupta P, Susanti D. **2017**. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. Biomed Pharmacother. 96:348-360.
- Al-Awwadi **2013**. Anti diabetics effect of *Achillea santolina* aqueous leaves extract. Int. J. Med. Plants Res. 4. 151-156.
- Al-Rowais N. A. **2002**. Herbal medicine in the treatment of diabetes mellitus. Saudi Med J. 23. 1327-1331
- Alvarado-Rico S., y Castro L. **2010**. Histología del hígado de ratas tratadas con una infusión de hojas de higuera (*Ficus Carica*): Reporte de caso. Rev. Fac. Cienc. Vet. 51. 99-103.
- Anandharajan R., Jaiganesh S., Shankernarayanan N.P., Viswakarmac R.A., Balakrishnand A., **2005**. *In vitro* glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut4, PI3 kinase and PPAR γ in L6 myotubes. Phytomedicine. 13. 434–441.
- Antonelli-Ushirobira T.M., Kaneshima E.N., Gabriel M., Audi E.A., Marques L.C., J.C.P.Mello. **2010**. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. Food and Chemical Toxicology. 48. 1817-1820
- Arias-Duran L. **2015**. “Determinación del efecto vasorrelajante y antihipertensivo de la planta medicinal *Achillea millefolium*”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. UAEM.
- Arias-Duran L. **2018**. “Estudio fitoquímico biodirigido del extracto hexánico de *Achillea millefolium* para el aislamiento de los principios activos relajantes de musculatura lisa”. Tesis de maestría. Facultad de Farmacia. UAEM.
- Athmouni K, El Feki A, Ayadi H. **2018**. Hepatotoxic effects of Euphorbia rich fractions from *Euphorbia bivonae*-Relevance to cytotoxic and anti-tumor activities. Pathophysiology.
- Ávila-Villarreal G., González-Trujano M. E., Carballo-Villalobos A. I., Aguilar-Guadarrama B., García-Jiménez S., Giles-Rivas D. E., Castillo-España P., Villalobos-Molina R., Estrada-Soto S. **2016**. Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. J Ethnopharmacol. 192. 90-98.
- Baggio, C., Otofujii, G.M., Freitas, C.S., Mayer, B., Marques, M.C., Mesia-Vela, S., **2016**. Modulation of antioxidant systems by subchronic exposure to the aqueous extract of leaves from *Achillea millefolium* L. in rats. Nat Prod Res. 30. 613-615.



Baretta, I.,P., Felizardo, R., A.,Bimbato, V., F.,dos Santos, M., G.,Kassuya, C:, A.,Gasparotto Junior, A,da Silva C., R., de Oliveira, S:, M., Ferreira, J, Andreatini, R., **2012**. Anxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract. J Ethnopharmacol. 140. 46– 54.

Benedek, B., Gjoncaj, N., Saukel, J., Kopp, B., **2007a**. Distribution of Phenolic Compounds in Middleeuropean Taxa of the *Achillea millefolium* L. Aggregate. Chem biodivers. 4.

Benedek, B., Kopp, B., Melzig, M.F., **2007b**. *Achillea millefolium* L. s.l. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition?. J Ethnopharmacol. 113. 312–317

Berger J. y Moller D. E., **2002**. The mechanisms of action of PPARs. Annu. Rev. Med. 53. 409–35

Bermúdez Valmore, Fernando Bermúdez, Naillet Arraiz, Elliuz Leal, Sergia Linares, Edgardo Mengual, Lisney Valdelamar, Moisés Rodríguez, Hamid Seyfi, Anilsa Amell, Marisol Carrillo, Carlos Silva, Alejandro Acosta, Johnny Añez, Carla Andara, Verónica Angulo, Gabriela Martins. **2007**. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 26. 76-86

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, **2009**. Tomado de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. Consultado. noviembre de 2018

Blancas-Flores G., Almanza-Pérez J. C., López-Roa R. I., Alarcón-Aguilar F. J., García-Macedo R., Cruz M., **2010**. La obesidad como un proceso inflamatorio. Bol Med Hosp Infant Mex. 67. 89-97

Castillo-Barcias J. A., 3. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Tomado de:

https://www.endocrino.org.co/wpcontent/uploads/2015/10/Fisiopatologia_de_la_Diabetes_Mellitus_Tipo_2_J_Castillo.pdf. Consultado: **oct 2018**

Castrejón V., Carbó R., Martínez M., **2007**. mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. Reb. 26. 49-57.

Candan, F., Unlu M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., Akpulat, H., **2003**. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 87. 215–220.

Castro-Serna, D., Castro-Martínez, M. G., **2006**. Biguanidas. Med Int Mex. 22. 439-49

Cavalcanti, A. M., Baggio, C.H., Freitas, C. S., Rieck, L., de Sousa, R. S., Da Silva-Santos, J.E., Mesia-Vela, S., Marques, M.C., **2006**. Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. J Ethnopharmacol. 107. 277-84.

Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Chada, A., Ravilla, R., Marco, A., Shekhawat, N. S., Montales, M. T., Kuriakose, K., Sasapu, A., Beebe, A., Patil, N., Musham, C. K., Lohani, G. P., y Mirza, W. **2017**. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. Front Endocrinol. 8. 1-12

Chávez-Silva F., Cerón-Romero L., Arias-Durán L., Navarrete-Vázquez G., Almanza-Pérez J., Román-Ramos R., Ramírez-Ávila G., Perea-Arango I., Villalobos-Molina R., Estrada-Soto S., **2018**. Antidiabetic effect of *Achillea millefolium* through multitarget interactions: α -glucosidases inhibition, insulin sensitization and insulin secretagogue activities. J Ethnopharmacol. 15. 212:1-7



Chen H., Xiong L., Wang W. J., **2017**. Reviews on α -glucosidase inhibitor from plant secondary metabolites. 15. 2915-2924

Chou, S. T., Peng, H. Y., Hsu, J. C., Lin, C. C., Shih, Y., **2013**. *Achillea millefolium* L. essential oil inhibits Lps-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Int J Mol Sci. 14. 12978-12993

Clark, R.B., **2002**, The role of PPARs in inflammation and immunity. J Leukoc Biol. 71.388-400.

Córdova-Villalobos, J. Á., Barriguete-Meléndez, J.A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., de León-May, M, E., Aguilar-Salinas, C.A., **2008**. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. Salud Pública Mex. 50. 419-427.

Dall'Acqua, S., Bolego, C., Cignarella, A., Gaion, R. M., Innocenti, G., **2011**. Vasoprotective activity of standardized *Achillea millefolium* extract. Phytomedicine. 18. 1031– 1036.

de Souza, P., Crestani, S., Vilhena da Silva R. de C., Gasparotto, F., Leite Kassuya, C. A, da Silva-Santos, J. E., Arquimedes Gasparotto, J., **2013**. Involvement of bradykinin and prostaglandins in the diuretic effects of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 149.157–161

Diabetes Care, **2018**, Standars of medical care in diabetes. 41. S1-S159

Dias MI, Barros L, Dueñas M, Pereira E, Carvalho AM, Alves RC, Oliveira MB, Santos-Buelga C, Ferreira IC. **2013**. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. Food Chemistry 141. 4152–4160

Dinneen S., Gerich J., Rizza R., **1992**. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med.10. 707-13.

Duque, J. E., López C., Cruz, N., Samudio, I., **2010**. Antitumor mechanisms of metformin: Signaling, metabolism, immunity and beyond. Universitas Scientiarum. 2.

Espejel-Nava J. A., **2014**. Efecto de *Tillandsia usneoides* Linneo sobre la síntesis y secreción de insulina en células RINm5F. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Fan Q, Zhao B, Wang C, Zhang J, Wu J, Wang T, Xu A. **2018**. Subchronic Toxicity Studies of Cortex Dictamnini Extracts in Mice and Its Potential Hepatotoxicity Mechanisms in Vitro. Molecules. 23. 2486

Fernyhough, M.E., Okine, E., Hausman, G., Vierck, J.L., Dodson, M.V., **2007**. PPAR γ and GLUT4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. Domest Anim Endocrinol. 33. 367–378.

Floris, A., **2008**. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. Vasc Health Risk Manag.4.1189–1195

Franklin, H., Epstein, M.D., **1999**. Glucose transporters and insulin action. Implication for insulin resistance and diabetes mellitus. N Engl J Med.



Freydottir, J., Logadottir, O.T., Omarsdottir, S.S., Vikingsson, A., Hardardottir, I., **2016**. A polysaccharide fraction from *Achillea millefolium* increases cytokine secretion and reduces activation of Akt, ERK and NF- κ B in THP-1 monocytes. *Carbohydr Polym.* 5. 131-138.

García A. G., **1995**. Farmacología de los canales iónicos. Fundación Dr. Antonio Steve. 37-42

Ghazarian M., Luck H., Revelo X. S., Winer S., Winer D. A., **2015**. Immunopathology of Adipose Tissue during Metabolic Syndrome. *Turk Patoloji Derg.* 31. 172-80. Review

Goncalves S. y Romano A., **2016**. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago*(Plantaginaceae). *Industrial Crops and Products.* 83. 213–226

Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes tipo 2, PAHO, **2006**

Guillausseau, P.J., Meas, T., Virally, M.,Laloi-Michelin, M., Medeau, V., Kevorkian, J.-P., **2008**. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 34. S43-S48

Gutiérrez-Ruiz J., Velázquez-Paniagua M., Prieto-Gómez B., **2011**. El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Rev Endocrinol Nutr.*19. 154-162

Guzmán-Ávila R, Flores-Morales V, Paoli P, Camici G, Ramírez-Espinosa JJ, Cerón-Romero L, Navarrete-Vázquez G, Hidalgo-Figueroa S, Yolanda Rios M, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S. **2018**. Ursolic acid derivatives as potential antidiabetic agents: In vitro, in vivo, and in silico studies. *Drug Dev Res.* 79. 70-80

Hayashi K., Kojima R., y Ito M., **2006**. Strain Differences in the Diabetogenic Activity of Streptozotocin in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29(6) 1110—1119

Hernández-Galicia, E., Hernandez-Galicia E., Aguilar-Contreras A., Aguilar-Santamaria L., Roman-Ramos R., Chavez-Miranda A.A., Garcia- Vega L.M., Flores-Saenz J.L., & Alarcon-Aguilar F.J., **2002**. Studies on hypoglycemic activity of mexican medicinal plants, *proc. West. Pharmacol. Soc*1. 45.18-124

Hernández-Morales M. **2018**. “Efecto traqueorrelajante en un modelo ex vivo de las diferentes partes que constituyen a la planta medicinal *Achillea millefolium*”. Tesis de licenciatura. Facultad de Farmacia. UAEM.

Hernández-Vázquez, E., Ocampo-Montalban, H., Cerón-Romero, L., Cruz, M., Gomez-Zamudio, J., Hiriart-Valencia, G., Villalobos-Molina, R., Flores-Flores, A., Estrada-Soto, S., **2017**. Antidiabetic, antidyslipidemic and toxicity profile of ENV-2: A potent pyrazole derivative against diabetes and related diseases. *Eur J Pharmacol.* 15. 159-166.

Herrera-Navarro A. M., Teról-Villalobos I., **2008**. Estudio del movimiento del calcio intracelular de células de Leucocitos mediante procesamiento morfológico de imágenes. 6º Congreso Internacional sobre Innovación y Desarrollo Tecnológico

Hidalgo-Figueroa, S., Ramírez-Espinosa, J.J., Estrada-Soto, S., Almanza-Pérez, J. C., Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F. J., Hernández-Rosado, J. V., Moreno-Díaz, H., Díaz-Coutiño, D., Navarrete-Vázquez G., **2013**. Discovery of thiazolidine-2,4-dione/biphenylcarbonitrile hybrid as dual PPAR α/γ modulator with Antidiabetic Effect: *In vitro*, *In Silico* and *In Vivo* approaches. *Chem Biol Drug Des.* 81. 474–483.



IDF Diabetes Atlas, 2017, seventh edition. Tomado de: <http://www.diabetesatlas.org/>. Consultado: **oct 2018**

Innocenti, L. G., Vegeto, E., Dall'Acqua, S., Ciana, P., Giorgetti, M., Agradi, E., Sozzi A., Fico, G., Tome, F., **2007**. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium*. *Phytomedicine*. 14.147–152

Jorge O. A. y Jorge A. D., **2005**. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. *Rev Esp Enferm Dig*. 97. 115-124.

Joshi, S. R., Parikh, R.M., Das, A. K., **2007**. Insulin History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *J Assoc Physicians India*. 55. 19-25

Kellett, G.L., Brot-Laroche, E., Mace, O.J., Leturque, A., **2008**. Sugar Absorption in the Intestine: The Role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.*, 28. 35–54.

Koushyar, H., Koushyar, M. M., Byraml, G., Feizpour, A., Golamnezhad, Z., Boskabady, M. H., **2013**. The effect of hydroethanol extract of *Achillea millefolium* on β -adrenoceptors of guinea pig tracheal smooth muscle. *Indian J Pharm Sci.* 400-405.

Kwon H y Pessin J.E., **2013**. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol*. 4. 1-13

Larsen, T. M., Toubro, S., Astrup, A., **2003**. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes: is increased fatness commensurate with long-term efficacy?. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 27. 147-61.

Li, Y., Zhang, M. L., Cong, B., Wang, S. M., Dong, M., Sauriol, F... & Kiyota, H., **2011**. Achillinin A, a cytotoxic guaianolide from the flower of Yarrow, *Achillea millefolium*. *Biosci. biotechnol. Biochem*. 75, 1554-1556.

Li, Y., Zhu, M. C., Zhang, M. L., Wang, Y. F., Dong, M., Shi, Q. W., Huo, C. H., Sauriol, F., Kiyota, H., Gu, Y. C., Cong, B., **2012**. Achillinin B and C, new sesquiterpene dimers isolated from *Achillea millefolium*. *Tetrahedron Lett*, 53, 2601-2603.

Nakano, M., Inui A., **2012**. Metformin and incretin-based therapies up-regulate central and peripheral Adenosine monophosphate-activated protein affecting appetite and metabolism. *Indian J Endocrinol Metab*. 16. S529-S531.

Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., Zinman, B., **2009**. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes care* 32. 193-203.

Nurul, I., Hyun, A.J., Hee, S. S., Hye, M.K., Jae, S.C., **2013**. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Arch. Pharm. Res*. 36. 542–552.

Mateos-Santa Cruz, N., Zacarías-Castillo, R., **2002**. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*, 5. 33-41

Martínez-Aldino I. Y., **2019**. Desarrollo de las pruebas de identidad y composición para el control de calidad de la droga cruda de *Achillea millefolium* (Asteraceae) comercializada en México. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM.



Martínez, S. M., **2000**. Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa. *Revista del Hospital General Dr. Manuel Gea González*, 3.118-120.

Meyer O., **2003**. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*. 140. 21-30

Miranda-Perez, M. E., Ortega-Camarillo, C., Escobar-Villanueva, M. C., Blancas-Flores, G., Alarcon-Aguilar, F. J., **2016**. Cucurbita ficifolia Bouché increases insulin secretion in RINm5F cells through an influx of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *J Ethnopharmacol*. 188.159–166.

Moreira D de L., Teixeira S. S., Monteiro M. H. D., De-Oliveira A. C. A.X., Paumgarten F. J. R. **2014**. Traditional use and safety of herbal medicines. *Rev. bras. farmacogn*. 24. 248-257

Morimoto-Martínez S., **2000**. Mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la síntesis de insulina por glucosa, *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González*, 3. 118-120.

Morimoto S., y Yahara K., **2018**. Identification of stress responsive genes by studying specific relationships between mRNA and protein abundance. *Heliyon*. 4. e00558.

Morlett-Chávez J., Esquivel T., Flores-Pedraja I., Zugasti-Cruz A., Cruz-Galicia G., Cepeda Nieto A.C. Marcadores moleculares para el diagnóstico temprano de la diabetes mellitus. Tomado de: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM2/MARCADORES%20MOLECULARES%20PARA%20EL%20DIAGN%20STICO%20TEMPRANO%20DE%20LA%20DIABETES%20MELLITUS.pdf>. Consultado: **oct 2018**

de Moura-Sperotto ND, Steffens L, Veríssimo RM, Henn JG, Péres VF, Vianna P, Chies JAB, Roehe A, Saffi J, Moura DJ. **2018**. Wound healing and anti-inflammatory activities induced by a *Plantago australis* hydroethanolic extract standardized in verbascoside. *J Ethnopharmacol*. 225:178-188.

Mustafa, K.G., Ganai, B.A., Akbar, S., Dar, M.Y., Masood, A., **2012**. α -Cell protective efficacy, hypoglycemic and hypolipidemic effects of extracts of *Achillea millifolium* in diabetic rats. *Chin J Nat Med*. 10. 185-189.

OECD. **2008**. Acute oral toxicity: up-and-down procedure

Olivares-Reyes J.A., Arellano-Plancarte A., **2008**. Bases moleculares de las acciones de la insulina. 27. 9-18

Ottanà R., Maccari R., Mortier J., Caselli A., Amuso S., Camici G., Rotondo A., Wolber G., Paoli P., **2014**. Synthesis, biological activity and structure activity relationships of new benzoic acid-based protein tyrosine phosphatase inhibitors endowed with insulinomimetic effects in mouse C2C12 skeletal muscle cells. *Eur J Med Chem*. 71. 112-27

Ornelas-Mendoza K.G., **2018**. Determinación del efecto antidiabético y estudio toxicológico del extracto hidroalcohólico de *Plantago australis* en modelos in vivo. Tesis de maestría. UAEM

Ortiz-Andrade, R. R., Sánchez-Salgado, J. C., Navarrete-Vázquez, G., Webster, S. P., Binnie, M., García-Jiménez S., León-Rivera, I., Cigarroa-Vázquez P., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., **2008**. Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rats. *Diabetes Obes Metab*. 10. 1097–1104.



Ortiz-Andrade, R.R., García-Jiménez, S., Castillo-España P., Ramírez-Ávila G., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., **2007**. α -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent, J Ethnopharmacol. 109. 48–53.

OMS, **2013**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023.

OMS, **2013-1**. 56ª Asamblea mundial de la salud. Punto 14.10 del orden del día provisional.

OMS, **2016** Perfiles de los países para la diabetes, México **2016**. Tomado de: www.who.int/diabetes/countryprofiles/mex_es.pdf?ua=1. Consultado en: oct 2018

Ottanà R, Maccari R, Mortier J, Caselli A, Amuso S, Camici G, Rotondo A, Wolber G, Paoli P., **2014**. Synthesis, biological activity and structure-activity relationships of new benzoic acid-based protein tyrosine phosphatase inhibitors endowed with insulinomimetic effects in mouse C2C12 skeletal muscle cells. European Journal of Medicinal Chemistry. 71. 112-127

Palmeiro N. S., Esteves-Almeida C., Ghedini P. C., Goulart L. S., Baldisserotto B., **2002**. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Plantago australis* hydroalcoholic extract. Acta Farm. Bonaerense. 21. 89-92

Petlevski R, Hadzija M, Slijepcevic M, Juretic D., **2001**. Effect of 'antidiabetic' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. J Ethnopharmacol. 75.181-184.

Perez-Gutierrez R. M. y Damian-Guzman M., **2012**. Meliadinol: A Potent α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitor Isolated from *Azadirachta indica* Leaves and *in Vivo* Antidiabetic Property in

Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Type 2 Diabetes in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 35. 1516–1524

Potrich F. B., Allemand, A., da Silva, L.M., Dos Santos, A. C., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Mendes, D. A., Andre E., Werner, M.F., Marques, M. C., **2010**. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: Involvement of the antioxidant system. J Ethnopharmacol. 130. 85–92

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

Ramírez-Espinosa, et al., 2011

Ramírez, G., Zavala, M. Pérez, J., Zamilpa, A., **2012**. *in vitro* screening of medicinal plants used in México as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. Evid Based Complement Alternat Med. 2012. 6

Roche E., **2003**. Diabetes tipo 2: glucolipototoxicidad y disfunción de la célula β pancreática. *Ars Pharmaceutica*, 44. 313-332.

Rodríguez-Morán M., Guerrero-Romero F., Lazcano-Burciaga G., **1998**. Lipid- and Glucose-Lowering Efficacy of *Plantago Psyllium* in Type II Diabetes. Diab Comp. 12. 273–278

Rosidah, Yam MF, Sadikun A, Ahmad M, Akowuah GA, Asmawi MZ. **2009**. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. J Ethnopharmacol. 22. 244-249



Rydén, L., Standl, E., Bartnik, M., Van den Berghe, G., Betteridge, J., De Boer, M. J., ... & Priori, S. **2007**. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. *Eur. Heart J.* 28(1), 88–136.

Santa Cruz N.M. y Zacarías Castillo R., **2002**. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Rev Hosp Gral Dr. M Gea González.* 5. 33-41

Samuelsen A. B. **2000**. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol.* 71. 1–21

Schlede E., Genschow E., Spielmann H., Stropp G., Kayser D. **2005**. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD50 test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 42. 15–23

Seung-Hyung K., Jung-Hee H., y Young-Cheol L., **2013**. Ursolic acid, a potential PPAR γ agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma. *European Journal of Pharmacology.* **701. 131-143**

SGA. **2011**. Sistema globalmente armonizado de clasificación de etiquetado de productos químicos (SGA). 4ta. edición. Naciones unidas.

Shepherd P. R., y Kahn B.B., **1999**. Glucose transporters and insulin action. *The New England Journal of Medicine.* 341. 249-257

Shroff, G., **2016**. Therapeutic potential of human embryonic stem cells in type 2 diabetes mellitus. *World J Stem Cells.* 8(7), 223.

Soto-Estrada G., Moreno-Altamirano L., Díaz D. P., **2016**. Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad. *Rev Fac Med UNAM.* 59. 8-22

Terechenko Luhers N. S.; Baute Geymonat A. E.; Zamonsky Acuña J. N., **2015**. Adherencia al tratamiento en pacientes con Diagnóstico de Diabetes Mellitus Tipo II. *Biomedicina.* 10. 20 -33

Trisha, Dunning, AM., **2013**. Brief Overview of diabetes the disease. *Diabetes Education: Art, Science and Evidence.*

Troncoso Pantoja C., Delgado Segura D., Rubilar Villalobos C., **2013**. Adherencia al tratamiento en pacientes con Diabetes tipo 2. *Rev Costarr Salud Pública.* 22. 9-13.

Torres-Piedra, M., Ortiz-Andrade, R., Villalobos-Molina, R., Singh, N., Medina-Franco, J. L., Webster, S.P., Binnie, M., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S. **2010**. Comparative study of flavonoid analogues on streptozotocine nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *Eur J Med Chem.* 45. 2606-2612.

Venditti, A., Maggi, Sauro Vittori, F., Papa, F., Serrilli, A.M., Di Cecco, M., Ciaschetti, G., Mandrone, M., Poli, F., Bianco, A., **2015**. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of *Achillea tenorii*. *Pharm Biol.* 53. 505–1510.

Vieira-Potter V. J., **2014**. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cell Microbiol.* 16. 1484–1492



Wang, Y. X., **2010**. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases, Cell Res. 20.124-137.

Wang et al., **2000** mail cata

Walum E. **1998**. Acute Oral Toxicity. Environmental Health Perspectives. 106. 497-503

Yaesh S, Jamal Q, Khan AU, Gilani AH., **2006**. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. Phytother Res. 20. 546–551.

Yan, J., Zhang, G., Pan, J., Wang, Y., **2014**. α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. Int J Biol Macromol.. 64. 213– 223.

Yazdanparast, R., Ardestani, A., Jamshidi, S., **2007**. Experimental diabetes treated with *Achillea santolina*: Effect on pancreatic oxidative parameters. J Ethnopharmacol. 112. 13–18.

Yong-Xu, **2010**. PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. Cell Research. 20. 124-137.

Yuet Ping K, Darah I, Chen Y, Sreeramanan S, Sasidharan S. **2013**. Acute and Subchronic Toxicity Study of *Euphorbia hirta* L. Methanol Extract in Rats. Biomed Res Int. 2013:182064

Zhou G., Myers, R., Li, L., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M., Goodyear, L.J., Moller D.E., **2001**. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108. 1167–1174

Fu Z, Gilbert ER, Liu D., **2013**. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. Curr Diabetes Rev. 9. 25–53.

Zolghadri, Y., Fazeli, M., Kooshki, M., Shomali, T., Karimaghayee, N., Dehghani M., **2014**. *Achillea millefolium* L. Hydro- Alcoholic Extract Protects Pancreatic Cells by Down Regulating IL- 1 β and iNOS Gene Expression in Diabetic Rats. Int J Mol Cell Med Autumn. 3. 4 255-262.



Antidiabetic effect of *Achillea millefolium* through multitarget interactions: α -glucosidases inhibition, insulin sensitization and insulin secretagogue activities



Fabiola Chávez-Silva^{a,1}, Litzia Cerón-Romero^a, Luis Arias-Durán^a, Gabriel Navarrete-Vázquez^a, Julio Almanza-Pérez^b, Rubén Román-Ramos^b, Guillermo Ramírez-Ávila^c, Irene Perea-Arango^d, Rafael Villalobos-Molina^e, Samuel Estrada-Soto^{a,*}

^a Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

^b Laboratorio de Farmacología, Depto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

^c Centro de Investigación Biomédica del Sur (IMSS), Xochitepec, Morelos 62790, Mexico

^d Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

^e Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalneantla, Estado de México 54090, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Achillea millefolium
 Antidiabetic
 Calcium mobilization
 Insulin secretion
 Insulin sensitization
 PPAR γ

ABSTRACT

Ethnopharmacological importance: *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) is a perennial herb used in Mexican folk medicine for treatment of several pathologies, including inflammatory and spasmodic gastrointestinal disorders, hepatobiliary complaints, overactive cardiovascular, respiratory ailments and diabetes.

Aim of the study: To evaluate the potential antidiabetic effect *in vivo* and to establish the potential mode of action through *in vitro* approaches of *Achillea millefolium*.

Materials and methods: The antidiabetic effect of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* (HAEAm) was evaluated on the oral glucose tolerance tests, in normoglycemic and experimental Type 2 diabetic mice models. In addition, we evaluated the possible mode of action in *in vitro* assays to determine α -glucosidases inhibition, the insulin secretion and calcium mobilization in RINm5F cells and PPAR γ and GLUT4 expression in 3T3-L1 cells.

Results: HAEAm showed significant glucose diminution on oral glucose tolerance test and in acute experimental Type 2 diabetic assay with respect to the control ($p < 0.05$). In addition, HAEAm promoted the α -glucosidases inhibition by 55% at 1 mg/ml respect to control. On the other hand, HAEAm increased the PPAR γ (five-times) and GLUT4 (two-fold) relative expression than control ($p < 0.05$). Finally, HAEAm significantly increased the insulin secretion and $[Ca^{2+}]_i$ compared with control.

Conclusion: The HAEAm possesses *in vivo* antidiabetic effect, having such effect through multitarget modes of action that involve antihyperglycemic (α -glucosidases inhibition), hypoglycemic (insulin secretion) and potential insulin sensitizer (PPAR γ /GLUT4 overexpression) actions.

1. Introduction

The type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a non-transmissible chronic metabolic disorder of multiple etiologies, characterized by sustained hyperglycemia, and is the result of inadequate insulin secretion or its defective action, or a combination of both (Trisha and Dunning, 2013; Rydén et al., 2007). Recently, the International Diabetes Federation (IDF) estimated that this disease impacts 415 million people in the world, and there are 318 millions of adults with impaired glucose

tolerance (IDF, 2015), which put them at high risk of developing the disease in the future. In fact, one of two adults with diabetes is undiagnosed; furthermore, persons with T2DM suffer a progression of the disease by a combination of several grades of insulin resistance and relative insulin deficiency. Insulin resistance is caused by impaired β -cell functioning, which is usually associated with abnormal insulin secretion or defective action (Shroff, 2016). The classical symptoms of T2DM are polyuria, polydipsia and polyphagia, among others; also T2DM is associated to some complications such as neuropathy,

* Corresponding author.

E-mail address: enoch@uaem.mx (S. Estrada-Soto).

¹ Taken in part from the Ph.D. Thesis of Fabiola Chávez-Silva.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.005>

Received 12 April 2017; Received in revised form 7 October 2017; Accepted 7 October 2017

Available online 12 October 2017

0378-8741/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
 Facultad de Farmacia



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

Nombre del alumno: Fabiola Chávez Silva

Título de la tesis: "ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea millefolium* y *Plantago australis* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS"

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

26/02/19

Fecha



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

Nombre del alumno: Fabiola Chávez Silva

Título de la tesis: “ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea millefolium* y *Plantago australis* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. 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

25/03/2014

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



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

Nombre del alumno: Fabiola Chávez Silva

Título de la tesis: "ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea millefolium* y *Plantago australis* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Rafael Villalobos Molina

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):

Raf. Villalobos Molina
 Firma del miembro del jurado

20-05-2019
 Fecha



Escuela de Posgrado
 Facultad de Farmacia



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

Nombre del alumno: Fabiola Chávez Silva

Título de la tesis: "ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea millefolium* y *Plantago australis* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Rachel Mata Essayag

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

25/10/2019
 Fecha



Escuela de Posgrado
 Facultad de Farmacia



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

Nombre del alumno: Fabiola Chávez Silva

Título de la tesis: "ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea millefolium* y *Plantago australis* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio Cesar Rivera Leyva

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):


Julio Cesar Rivera Leyva 3/04/2017
 Firma del miembro del jurado

22/03/19
 Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



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

Nombre del alumno: Fabiola Chávez Silva

Título de la tesis: **"ESTUDIO FARMACOLÓGICO, TOXICOLÓGICO Y QUÍMICO PRELIMINAR DE *Achillea millefolium* y *Plantago australis* COMO POTENCIALES AGENTES ANTIDIABÉTICOS"**

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Irene Perea Arango**

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

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

25/03/2019
Fecha