



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA  
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERGLUCÉMICA E  
HIPOGLUCEMIANTE DE COMPUESTOS COORDINADOS DE COBRE  
(CASIOPEÍNAS) EN MODELOS EXPERIMENTALES”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN MEDICINA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA:  
IFB. VICTORIA VERA PINEDA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ**

**CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.**

**JUNIO, 2020.**

## **Lugar y fecha de realización**

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en el periodo comprendido de enero de 2018 a diciembre de 2019.

## **Miembros del comité tutorial**

**Tutor principal:** Dr. Juan José Acevedo Fernández

**Tutor personal:** Dra. Gabriela Castañeda Corral

**Vocal:** Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia

**Vocal:** Dr. Luis Cañedo Dorantes

**Vocal:** Dra. Lena Ruiz Azuara

## **Miembros del jurado de examen**

**Presidente:** M. en C. José Santos Ángeles Chimal

**Secretario:** Dra. Gabriela Castañeda Corral

**1° vocal:** Dra. Yanis Toledano Magaña

**2° vocal:** Dr. Juan Carlos García Ramos

**3° vocal:** Dr. Juan José Acevedo Fernández

## **Agradecimiento de financiamiento**

Durante la realización del proyecto se contó con el apoyo de la beca de maestría No.197501 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

## **Dedicatoria**

**CTA**

Porque sin tus mil maneras de apoyarme, sin duda este proceso habría sido totalmente diferente. Pero lograste hacer de mis días largos lo más divertidos, decenas de noches de desvelo amenas y productivas, mis días tristes los convertiste en tardes de cine y palomitas. Por todos los detalles que fueron sonrisas, siempre lograste sorprenderme con algo nuevo.

Gracias por hacerme totalmente feliz.

*“A los que ya no están, pero sus recuerdos  
me acompañan siempre”*

### **A mi familia**

Aunque incontables veces me han dicho “no entendemos lo que haces”, sé que siempre cuento con todo su apoyo para emprender nuevas metas. Cada uno de ustedes, me ha demostrado a su manera (peculiar) su confianza y cariño.

Infinitas gracias por estar ahí.

## **Agradecimientos**

### **A mi comité tutorial y comité revisor de tesis**

Agradezco que siempre se hayan tomado el tiempo para asistir a mis tutoriales, sus observaciones siempre tan objetivas contribuyeron significativamente a mi formación durante la maestría, además, me ayudaron a resolver dudas y plantearme preguntas a fin de mejorar mi trabajo de investigación. No me cabe duda de que aún me queda mucho por aprender, pero les reitero que estoy agradecida que hayan formado parte de este proceso. Es grato conocerlos y tener la oportunidad de aprender de sus conocimientos y experiencias.

### **Al inigualable Laboratorio 13**

Dr. Juan José Acevedo, Mtra. Elizabeth Negrete y IQ. Mayra Cedillo, gracias por la confianza, por las risas, el apoyo y por todo la disposición que siempre me mostraron durante el desarrollo de mi tesis. Y, sobre todo por dejarme experimentar y aprender sin restricciones. Por cada consejo a fin de mejorar en todas direcciones.

### **A mis amigos y familia Morelense**

Amigos de toda la vida y a los que conocí durante esta “aventura”, pero que sin duda me animaron y creyeron siempre en mí. Gracias por hacerme sentir en casa y sobre todo en familia, por todas las tardes de juego, de cine, de helados y ¡elotes!, por las cientos de sonrisas y abrazos, gracias por cada día.

## ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
II. ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
III. ABREVIATURAS .....	X
IV. RESUMEN .....	XII
1.0 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Diabetes mellitus .....	1
1.2 Epidemiología.....	1
1.3 Clasificación de la DM .....	2
1.4 Regulación de la glucemia.....	4
1.4.2 Digestión de carbohidratos .....	6
1.4.3 Absorción de monosacáridos.....	7
1.4.4 Secreción de insulina inducida por glucosa.....	11
1.4.4.1 Cascada de señalización del Receptor de insulina.....	12
1.5 Alteraciones bioquímicas inducidas por hiperglucemia crónica. ....	14
1.5.1 Incremento en la actividad de la vía de los polioles. ....	16
1.5.2 Activación de la vía de las hexosaminas. ....	16
1.5.3 Activación de la proteína cinasa C (PKC).....	16
1.5.4 Acumulación de productos terminales de glucosilación avanzada (AGEs) .....	16
1.6 Complicaciones de la diabetes.....	17
1.6.1 Complicaciones agudas .....	17
1.6.2 Complicaciones crónicas .....	18
1.6.2.1 Microvasculares.....	18
1.6.2.1.1 Retinopatía.....	18
1.6.2.1.2 Nefropatía .....	19
1.6.2.1.3 Neuropatía .....	19
1.6.2.2 Macrovasculares .....	20
1.7 Tratamiento de la diabetes.....	21
2.0 ANTECEDENTES .....	24
2.1 Casiopeínas.....	25
2.1.2 Actividad antitumoral de las Casiopeínas .....	26

2.1.3 Identificación de objetivos secundarios a través de la farmacología de sistemas .....	28
2.1.4 Características farmacocinéticas de las Casiopeínas .....	31
2.1.5 Toxicidad de las Casiopeínas .....	34
3.0 JUSTIFICACIÓN .....	36
4.0 HIPÓTESIS .....	37
5.0 OBJETIVOS .....	37
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	37
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
6.0 METODOLOGÍA .....	38
6.1 Animales .....	38
6.2 Compuestos .....	38
6.3 Actividad anti-hiperglucemiante .....	42
6.4 Efecto de las Casiopeínas en la absorción intestinal de glucosa en el modelo de saco invertido .....	42
6.5 Actividad hipoglucemiante .....	43
6.6 Análisis estadísticos .....	43
7.0 RESULTADOS .....	45
7.1 Actividad anti-hiperglucemiante <i>in vivo</i> de las Casiopeínas en un modelo de hiperglucemia inducida por almidón. ....	45
7.2 Evaluación de la absorción intestinal de glucosa <i>in vitro</i> de las Casiopeínas en el modelo de saco intestinal invertido de rata .....	50
7.3 Actividad hipoglucemiante en ratones CD1 normoglucémicos .....	56
7.4 Actividad hipoglucemiante de las Casiopeínas en ratones diabéticos CD1. ....	61
8.0 DISCUSIÓN .....	65
8.1 Actividad anti-hiperglucemiante .....	65
8.1.1 Actividad anti-hiperglucemiante <i>in vivo</i> de las Casiopeínas en un modelo de hiperglucemia inducida por almidón. ....	65
8.1.2 Evaluación de la absorción intestinal de glucosa <i>in vitro</i> de las Casiopeínas en el modelo de saco intestinal invertido de rata .....	70
8.2 Actividad hipoglucemiante en ratones CD1 normoglucémicos .....	71
8.3 Actividad hipoglucemiante en ratones CD1 diabéticos por inducción con aloxano. ....	73
9.0 CONCLUSIONES .....	76
REFERENCIAS .....	78

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de la DM en 2019 y proyecciones de su prevalencia en 2030 y 2045, en población entre 20 y 79 años.	3
Figura 2. Homeostasis de la glucosa por acción de la insulina y glucagón.	5
Figura 3. Hidrólisis de los carbohidratos obtenidos de la dieta por acción de las enzimas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa.	7
Figura 4. Secreción de insulina en las células $\beta$ pancreáticas inducidas por glucosa.	12
Figura 5. Vías de señalización de la insulina.	13
Figura 6. Activación de vías metabólicas por hiperglucemia y saturación de la glucólisis.	20
Figura 7. Estructura general de las Casiopeínas.	24
Figura 8. Mapa de calor de las principales vías afectadas por el tratamiento de las células HeLa con Cas II gly	28
Figura 9. Red de vías perturbadas de Casiopeína II-gly.	29
Figura 10. Estandarización del modelo de hiperglucemia inducida por almidón de maíz en ratas Wistar, macho.	42
Figura 11. Evaluación del efecto antihiperoglucémico de Cas III La, Cas II gly y Cas I gly.	45
Figura 12. Efecto de la empagliflozina, un inhibidor selectivo del cotransportador de glucosa, en la absorción intestinal de glucosa <i>in vitro</i> .	46
Figura 13. Inhibición de la absorción de glucosa <i>in vitro</i> por efecto de Cas III Ha.	48
Figura 14. Inhibición de la absorción de glucosa <i>in vitro</i> por efecto de Cas III ia	49
Figura 15. Inhibición de la absorción de glucosa <i>in vitro</i> por efecto de Cas VI gly.	50
Figura 16. Inhibición de la absorción de glucosa <i>in vitro</i> por efecto de Cas VIII gly.	50
Figura 17. Cinéticas del efecto hipoglucemiante de insulina, glibenclamida y agua en ratones CD1.	52
Figura 18. Evaluación del efecto hipoglucémico de las Casiopeínas Cas IV gly, Cas VIII gly y Cas III La en ratones CD1 normoglucémicos.	54
Figura 19. Cinéticas hipoglucemiantes del control de insulina y el vehículo utilizado en cada tratamiento	56
Figura 20. Evaluación del efecto hipoglucémico de las Casiopeínas Cas VI gly, Cas IV gly y Cas III Ha en ratones CD1 diabéticos.	58
Figura 21. Distribución de la relación de Log P y el efecto antihiperoglucemiante	61

Figura 22. Distribución de la relación de $t_{1/2} K_{10}$ ( $h^{-1}$ ) y el efecto antihyperglucemiante	64
Figura 23. Distribución de la relación entre Log P y el efecto hipoglucemiante	66

## II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los transportadores SGLT1, SGLT2 y SGLT3.	8
Tabla 2. Características de los transportadores de monosacáridos	9
Tabla 3. Fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus.	22
Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos <i>in vivo</i> de algunas Casiopeínas	31
Tabla 5. Características fisicoquímicas de las Casiopeínas.	32
Tabla 6. Efectos citotóxicos en linfocitos (HPBL) y macrófagos (HPBM) de sangre periférica.	33
Tabla 7. Toxicidad ( $LD_{50}$ ) en ratones y ratas Wistar, machos.	34
Tabla 8. Estructura, nombre químico y clave de los compuestos de coordinación evaluados	37
Tabla 9. Porcentajes de inhibición en la actividad anti-hiperglucemiante	43
Tabla 10. Porcentajes de inhibición de la absorción intestinal de las Casiopeínas	47
Tabla 11. Resumen de la eficacia y potencia de las Casiopeínas en el modelo de saco intestinal invertido.	51
Tabla 12. Porcentaje de disminución en la actividad hipoglucemiante calculados respecto al pico máximo y al ABC para las Casiopeínas.	53
Tabla 13. Porcentaje de disminución en la actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos CD1.	57

### III. ABREVIATURAS

<b>AGEs</b>	Productos terminales de glucosilación avanzada
<b>AR</b>	Aldosa reductasa
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>CAD</b>	Cetoacidosis diabética
<b>CCE</b>	Consejo de las Comunidades Europeas
<b>CDR</b>	Curva dosis – respuesta
<b>CL</b>	Aclaramiento
<b>Cav</b>	Caveolina
<b>CGRP</b>	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
<b>CH1</b>	Carcinoma de ovario chino
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EHH</b>	Estado hiperosmolar hiperglucémico
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ERK</b>	Quinasas reguladas por señal extracelular
<b>FID</b>	Federación Internacional de la Diabetes
<b>G3P</b>	Gliceraldehido-3-fosfato
<b>GFAT</b>	Fructosa-6-fosfato aminotransferasa
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagon tipo 1
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>GH31</b>	Glucósidos hidrolasa de la familia 31
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSK</b>	Gliceraldehido cinasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GK</b>	Hexocinasa
<b><math>\alpha</math>-HPA</b>	Alfa amilasa pancreática

<b>HPBL</b>	Linfocitos de sangre periférica humana
<b>HPBM</b>	Macrófagos de sangre periférica humana
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5 – trifosfato
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b>Lpa</b>	Lipoproteína a
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activadas por mitógenos
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MGAM</b>	Maltasa glucoamilasa
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activada
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>PD</b>	Pacientes diabéticos
<b>PK</b>	Farmacocinética
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PXN</b>	Red de rutas cruzadas
<b>QSAR</b>	Relación cuantitativa de la estructura – actividad
<b>RAGE</b>	Receptor para productos finales de glucosilación avanzada
<b>RD</b>	Retinopatía diabética
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SDH</b>	Sorbitol deshidrogenasa
<b>SGLT</b>	Transportador de glucosa asociado a sodio
<b>SI</b>	Sacarasa isomaltasa
<b>SU</b>	Sulfonilureas
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento transformante
<b>UDPGN</b>	Uridindifosfato N-acetilglucosamina
<b>VEGF</b>	Factor promotor de la permeabilidad

## IV. RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica, que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia como consecuencia de alteraciones en la secreción o acción de la insulina, desencadenando trastornos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y disfunción de diferentes órganos. Sin embargo, la DM tipo 2 (DM2) representa del 90-95% de todos los tipos de diabetes. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, hay 463 millones de personas con diabetes en el mundo. En la actualidad existe una variedad de alternativas terapéuticas, pero no son suficientes ni totalmente eficientes para lograr la meta normoglucémica y prevenir el progreso de la enfermedad. Por lo que, aún existe la necesidad de buscar nuevas y mejores terapias farmacológicas que minimicen los efectos adversos y secundarios de los tratamientos. Antecedentes generados de otras investigaciones sugieren que las Casiopeínas pueden tener efecto sobre la regulación en la homeostasis de la glucosa, por lo que en el trabajo se plantea determinar su potencial terapéutico contra la diabetes mellitus de estos compuestos utilizando el modelo de la actividad anti-hiperglucemiante, mediante: a) inhibición de la digestión de almidón (*in vivo*) y b) inhibición de la absorción intestinal de glucosa (*ex vivo*), y c) su capacidad hipoglucemiante en ratones CD1 normoglucémicos y diabéticos. Los resultados mostraron que todas las Casiopeínas poseen actividad sobre la inhibición de la digestión de almidón, sin embargo, Cas III La (1.07  $\mu\text{mol/kg}$ ; 55.5 %), Cas II gly (1.17  $\mu\text{mol/kg}$ ; 49.5 %) Cas I gly (0.9  $\mu\text{mol/kg}$ ; 48.9 %) y Cas III Ma (1.08  $\mu\text{mol/kg}$ ; 44.5 %) no presentaron diferencias estadísticas con el efecto de acarbosa (0.77  $\mu\text{mol/kg}$ ; 72.72 %). En cuanto a la inhibición de la absorción, los compuestos Cas VI gly, Cas III ia, Cas III Ha, y Cas VIII gly, exhibieron un mejor efecto: eficacia máxima ( $E_{\text{máx}}$  entre 72 y 68 %), potencia (rango  $DE_{50}$  entre 1.6 y 4.3  $\mu\text{M}$ ) y una potencia relativa de 49 a 18 veces mejor que emplagliflozina. En la actividad hipoglucemiantes en ratones normoglucémicos, todos los compuestos presentaron un efecto hipoglucémico del ABC igual e incluso mejor que glibenclamida, pero, Cas IV gly (2.38  $\mu\text{mol/kg}$ ; 17.12 %), Cas VIII gly (22.03  $\mu\text{mol/kg}$ ; 25.35 %) y Cas III Ha (18.18  $\mu\text{mol/kg}$ ; 16.85 %), no presentaron diferencias estadísticas en cuanto a su efecto del ABC al ser comparado con el efecto hipoglucémico de insulina (0.040  $\mu\text{mol/kg}$ ; 10.06 %). Para la evaluación en ratones diabéticos, se seleccionaron los compuestos más prometedores de las tres actividades anteriores. En donde Cas III Ha (9.09  $\mu\text{mol/kg}$ ; 18.53 %), Cas VI gly (11.74  $\mu\text{mol/kg}$ ; 11.95 %) y Cas IV gly (11.9  $\mu\text{mol/kg}$ ; 8.91 %) no mostraron diferencias estadísticas en cuanto a su efecto antidiabético del ABC al ser comparados con el efecto de insulina (0.0396  $\mu\text{mol/kg}$ ; 12.68 %). En conjunto, estos resultados sugieren que las Casiopeína son candidatos potenciales para el tratamiento de la diabetes mellitus,

puesto que su efecto sobre la regulación de la glucosa se ha encontrado a dosis bajas y su toxicidad a dosis muy altas.

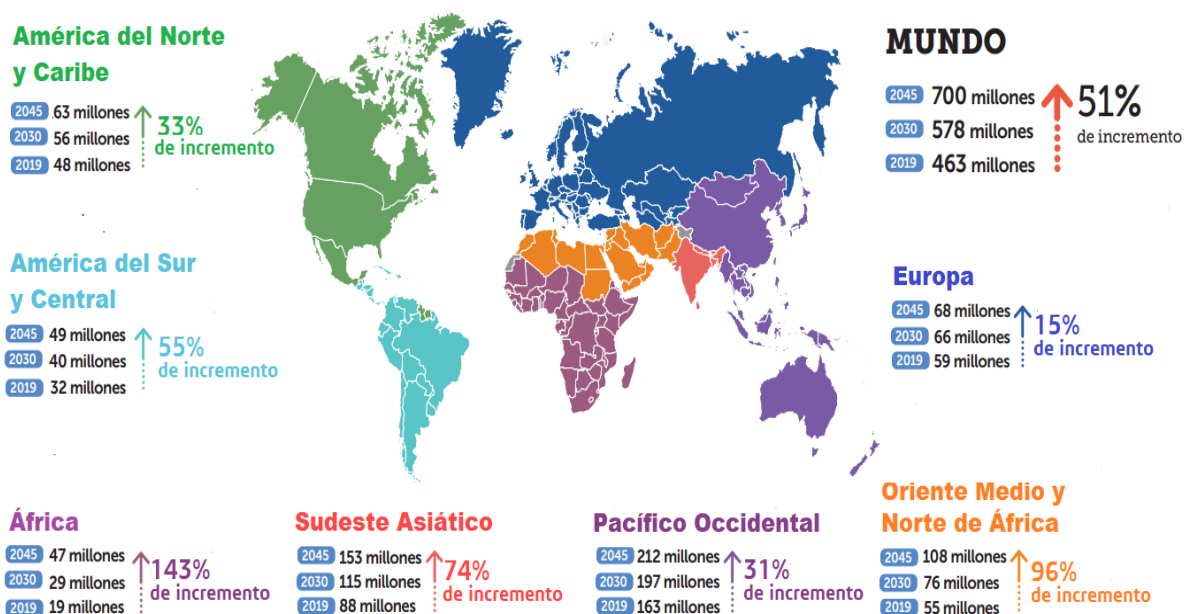
## **1.0 INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Diabetes mellitus**

De acuerdo con la Asociación Americana de la Diabetes (ADA) y a la Federación Internacional de la Diabetes (FID); la Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica<sup>1,2</sup>, que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia como consecuencia de alteraciones en la secreción o acción de la insulina, desencadenando trastornos en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas y la disfunción de diferentes órganos<sup>3,4</sup>. La DM, se halla frecuentemente relacionada con obesidad, alteraciones del metabolismo lipídico y proteínico como consecuencia de la acción ineficiente sobre los órganos diana (músculo, hígado y tejido graso)<sup>5</sup>, así como con hipertensión arterial y otros factores de riesgo cardiovascular, lo que constituye el síndrome metabólico<sup>6,7</sup>, mismo que en los últimos años ha alcanzado proporciones de auténtica epidemia<sup>2</sup>.

### **1.2 Epidemiología**

De acuerdo con las estimaciones de la FID en 2019, 4.2 millones de adultos de entre 20 y 79 años morirán como resultado de la diabetes y sus complicaciones, a nivel mundial. Donde, un mayor número de muertes se asocia con la diabetes en mujeres (2.3 millones) que en varones (1.9 millones)<sup>2</sup>. La DM2 es considerada como un problema de salud pública en todo el mundo y rápidamente se está convirtiendo en la epidemia del siglo XXI por su gran prevalencia. De acuerdo con los cálculos más frecuentes FID (2019), hay 463 millones de personas con diabetes en el mundo 20 y 79 años, para el año 2045, las cifras ascenderán a 700 millones de personas con diabetes, esta estimación incluye diabetes diagnosticada y no diagnosticada (Figura 1)<sup>8</sup>. De acuerdo con las estadísticas, tres cuartas partes de las personas con DM viven en países con ingresos medios y bajos, donde el síndrome se está acelerando a un ritmo impresionante. La DM impone en todas sus formas un alto costo humano, social y económico inaceptable, donde China, India, Estados Unidos, Pakistán, Brasil y México, son, (en ese orden) los países con mayor número de diabéticos.



**Figura 1. Prevalencia de la DM en 2019 y proyecciones de su prevalencia en 2030 y 2045, en población entre 20 y 79 años.** En 2019, hubo 463 millones de personas con diabetes y se estima que esta cifra aumenta a 578 millones para el año 2030, y a 700 millones para el 2045. Dos tercios de estas personas viven en zonas urbanas, y tres de cada cuatro están en edad activa (Tomada de FID, 2019).

En 2019 la FID reportó 19 millones de casos nuevos de diabetes en personas de 20 a 79 años, de las cuales 3.4 millones no habían sido diagnosticadas<sup>2</sup>. En México, la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres. Se han reportado estimaciones de hasta 70 mil muertes y cerca de 400,000 casos nuevos anuales<sup>8,9,10</sup>.

### 1.3 Clasificación de la DM

Esta enfermedad se clasifica bajo criterios del proceso patogénico que la desencadena. Por otro lado, existen otros criterios como edad de inicio y tipo de tratamiento que pueden ser considerados para su clasificación<sup>4,6,11</sup>.

De acuerdo con el proceso fisiopatológico que desencadena la diabetes se clasifica en:

- a) DM tipo 1: es una enfermedad crónica, anteriormente conocida como DM insulino-dependiente. La afección puede aparecer a cualquier edad, aunque ocurre con más

frecuencia en niños y jóvenes<sup>11</sup>, cuya causa es la deficiencia parcial o total de la secreción de insulina, como resultado de destrucción autoinmune de las células  $\beta^5$  que ocurre en los islotes pancreáticos con y por células efectoras de la inmunidad celular (linfocitos T CD8+)<sup>4,12,13</sup>, representa el 5 % de todos los casos de diabetes<sup>2</sup>. El daño se produce de forma progresiva durante meses o incluso años; los síntomas se presentan hasta que se han destruido aproximadamente el 90% de los islotes pancreáticos<sup>5</sup> y hay predisposición a sufrir cetosis<sup>11</sup>. Los síntomas característicos de la DM1 son: polidipsia, poliuria, pérdida de peso, visión borrosa, hambre constante y falta de energía<sup>2</sup>.

- b) DM tipo 2:** es un síndrome heterogéneo originado por la interacción genético-ambiental<sup>14</sup>. La DM2 se asocia con una disminución en la capacidad de las células  $\beta$  para secretar insulina y/o con alteraciones en el receptor de insulina (IR) y como consecuencias alteraciones en las vías de señalización<sup>4,15,13</sup>. Estas alteraciones desencadenan resistencia a la insulina en más del 75 % de los pacientes<sup>16</sup> y complicaciones crónicas: microvasculares (retinopatías, nefropatías y neuropatías) o macrovasculares que se manifiestan como cardiopatía coronaria, enfermedades cerebrovasculares y vasculares periféricas<sup>14,17,18,19</sup>. Tiene características epidémicas sobre la población y el constante aumento se atribuye en gran medida al desarrollo del sobrepeso y a la obesidad<sup>17,18</sup>.
- c) Tipos específicos de diabetes:** debido a otras causas, por ejemplo, síndrome de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y diabetes de inicio de madurez), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por sustancias químicas (como el uso de glucocorticoides, en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos)<sup>1</sup>.
- d) Diabetes mellitus gestacional (DMG) :** se define como una alteración del metabolismo de los hidratos de carbono con una prevalencia del 2 al 5 % durante el embarazo, dados los cambios propios durante esta etapa se eleva la resistencia a la insulina y glucosa<sup>20</sup>. Se calcula que la mayoría de los casos de hiperglucemia en el embarazo (70-90%) son

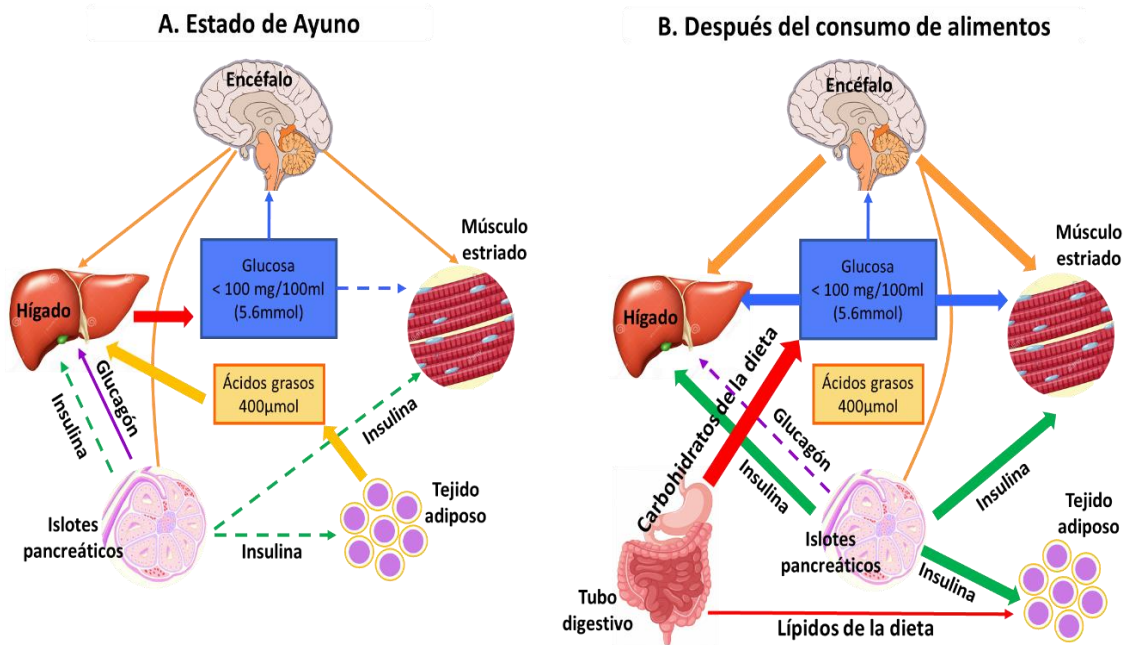
DMG<sup>21</sup>. Entre los factores de riesgo de desarrollar DMG se incluye la edad avanzada, el sobrepeso, obesidad y síndrome del ovario poliquístico<sup>1,2</sup>. Además, se manifiesta un mayor riesgo a padecer diabetes mellitus tipo 2<sup>19</sup>.

Sin embargo, la DM tipo 2 (DM2) representa del 90-95% de todos los tipos de diabetes y se calcula que al menos el 50% se encuentra sin diagnosticar<sup>4</sup>, tiene características epidémicas sobre la población y el constante aumento se atribuye en gran medida al desarrollo del sobrepeso y a la obesidad<sup>22,23</sup>. En los pacientes diabéticos no controlados es común observar un incremento en la actividad de diversas vías metabólicas, originando diversas complicaciones angiopáticas y neuropáticas; que, a su vez, ocasionan el cuadro clásico del síndrome diabético alterando la función visual, renal y cardiovascular. Por ello, para un control efectivo de la glucemia en el tratamiento de la diabetes, es fundamental comprender los mecanismos involucrados en el transporte de glucosa, y que, además determinan sus fluctuaciones postprandiales.

#### **1.4 Regulación de la glucemia**

La homeostasis de la glucosa es un proceso sistémico que involucra la participación de varios órganos y sistemas para la integración de información a través de múltiples vías de señalización (Figura 2). Para evitar las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas de glucosa derivadas de la ingesta de los alimentos se requiere de la coordinación eficaz de diversos procesos, que abarcan desde la digestión y absorción, hasta la glucólisis y síntesis de glucógeno. Si bien, el control endocrino de la glucemia es principalmente a través de acciones de la insulina, la regulación entre órganos mediante hormonas, nervios, factores locales y sustratos, también desempeñan una función importante. La insulina secretada por las células  $\beta$  desempeñan un papel central en el proceso homeostático, favorece la captación de glucosa después de la ingesta de alimentos, favoreciendo el metabolismo de la propia glucosa, lípidos y proteínas<sup>24-26</sup>. Además, disminuye la liberación de glucógeno, regula la síntesis hepática de glucosa en periodos de ayuno e inhibe la producción de glucosa cuando esta se encuentra en niveles altos. El glucagón, por su parte, mantiene en cifras fisiológicas

la glucemia en ausencia de carbohidratos exógenos al estimular la gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado<sup>24,27</sup>.

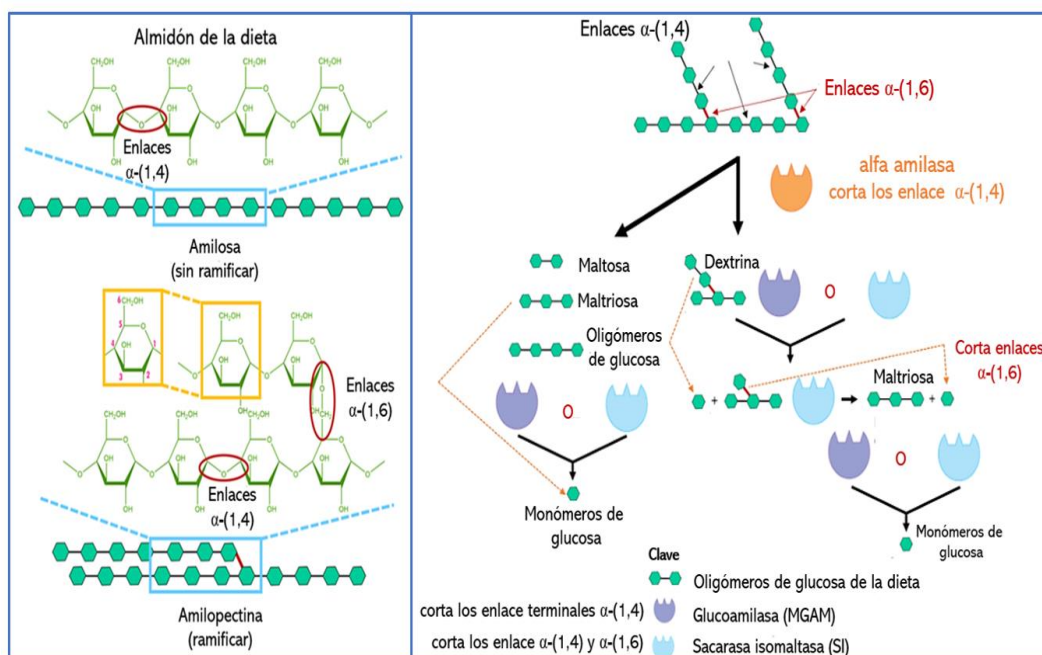


**Figura 2. Homeostasis de la glucosa por acción de la insulina y el glucagón.** A. La glucosa proviene principalmente del hígado y los ácidos grasos del tejido adiposo. En estado de ayuno, las concentraciones plasmáticas de insulina son bajas y se incrementan las concentraciones plasmáticas de glucagón. B. Después del consumo de alimentos: el incremento en la absorción de nutrientes aumenta las concentraciones plasmáticas de glucosa, lo que causa liberación de incretinas del intestino y estímulos neurales que favorecen la secreción de insulina. Las flechas gruesas reflejan acciones de intensidad relativa; las líneas punteadas indican poca o ninguna actividad (Tomada de Brunton, 2006)<sup>28</sup>.

Normalmente, la insulina regula las concentraciones de glucosa plasmática, pero se requiere un incremento en los niveles de glucosa para que exista una liberación de insulina por arriba de sus cifras basales y de otros estímulos tales como; hormonas insulínótropas liberadas del tubo digestivo y de vías neurales autonómicas. De modo que, las células  $\beta$  del páncreas se estimulan desde el momento de la ingesta de alimentos, durante de la absorción de nutrientes y hasta que la glucosa regresa a los niveles de ayuno ( $80 -110 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ). Como consecuencia de la llegada del quimo alimenticio al intestino, se liberan péptidos insulínótropos a partir de las células endocrinas especializadas en la mucosa intestinal<sup>29</sup>.

### 1.4.2 Digestión de carbohidratos

Los carbohidratos y almidones derivados de la dieta están compuestos de polímeros de glucosa (o glucanos). Estructuralmente, tienen dos componentes diferentes: cadenas lineales largas de glucanos (amilosa) y cadenas ampliamente ramificadas (amilopectina), unidos mediante enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6). Para que la digestión de estos polímeros se lleve a cabo en el sistemas digestivo, existen múltiples enzimas con acción de glucosidasas que coordinan de manera eficaz la hidrólisis de los polisacáridos provenientes de la dieta y liberar la glucosa (Figura 3)<sup>30-32</sup>. La enzima  $\alpha$ -amilasa salival comienza a actuar en la boca, cortando los enlaces endo  $\alpha$ -(1,4) en las moléculas de almidón para generar oligómeros más cortos. Después, la  $\alpha$ -amilasa pancreática ( $\alpha$ -HPA) actúa sobre los productos de la digestión salival en el intestino, para seguir hidrolizando los enlaces  $\alpha$ -(1,4) y originar oligosacáridos pequeños como maltosa (disacárido), maltotriosa (trisacárido) y dextrinas. Sin embargo, para que puedan ser absorbidas es necesario que las enzimas intestinales  $\alpha$ -glucosidasas como la maltasa-glucoamilasa (MGAM) y la sacarasa-isomaltasa (SI) terminen de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6) para obtener monómeros de glucosa<sup>31</sup>.



**Figura 3. Hidrólisis de los carbohidratos obtenidos de la dieta por acción de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.** Las enzimas  $\alpha$ -amilasas y  $\alpha$ -glucosidasas se encargan de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -(1,4) y  $\alpha$ -(1,6), respectivamente, de los carbohidratos provenientes de la dieta (modificada de Smith,2010)<sup>33</sup>.

La estructura tanto de las  $\alpha$ -amilasas como de las  $\alpha$ -glucosidasas se caracterizan por un dominio compuesto de ocho cadenas  $\beta$  y una hélice  $\alpha$ . Las  $\alpha$ -amilasas tienen residuos de ácido aspártico (Asp) y glutámico (Glu) en el sitio activo y pertenece a la familia de glucósidos hidrolasas 13 (GH13). Las  $\alpha$ -glucosidasas solo tiene residuos de Asp en el sitio activo y pertenece a la familia de glucósidos hidrolasas 31 (GH31). Estos residuos de aminoácidos los hacen ser altamente específicos y favorecen el acoplamiento de las cadenas de polisacáridos en el sitio activo. El análisis estructural sugiere que el mecanismo catalítico de todas estas enzimas es similar, y se lleva a cabo en dos pasos. En el primer paso, se forma un intermediario covalente de glicosil-enzima, ayudado por dos cadenas laterales que contienen ácido carboxílico conocidas como nucleófilo catalítico y catalizador ácido/base. En el segundo paso, se produce la hidrólisis del intermediario glucosil-enzima, dando lugar a la liberación de monómeros de glucosa<sup>34</sup>.

### 1.4.3 Absorción de monosacáridos

Los monosacáridos, obtenidos de la hidrólisis del almidón de la dieta, como la glucosa, la galactosa y la fructosa, se absorben en el duodeno y en la parte superior del yeyuno del intestino delgado. El transporte de glucosa a las células se realiza mediante dos tipos de proteínas acarreadoras, los cotransportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT por sus siglas en inglés *sodium-dependent glucose transporters*) y los sistemas facilitadores del transporte de glucosa (GLUT por sus siglas en inglés *glucose transporters*)<sup>24</sup>.

Los SGLT pertenecen a la familia de proteínas integrales de membrana acarreadoras de soluto 5 (SCL5), con una estructura central compuesta por un grupo de 14 segmentos helicoidales transmembrana (TM1 a TM14) de 664 aa, con los extremos N y C expuestos al periplasma<sup>35</sup>, la orientación de sus dominios le permite transportar glucosa al interior de las células mediante transporte activo. De esta familia hasta el momento se han identificado cinco miembros SGLT 1, SGLT 2, SGLT 3, SGLT 4 Y SGLT 5 (Tabla 1); que se diferencian por: 1) su afinidad por la glucosa y el sodio, 2) por la capacidad para transportar glucosa o galactosa, y 3) la ubicación tisular. Sin embargo, poco se conoce de la función del SGLT4 y SGLT5.

**Tabla 1. Comparación de los transportadores SGLT1, SGLT2 y SGLT3<sup>34</sup>.**

	<b>SGLT1</b>	<b>SGLT2</b>	<b>SGLT3</b>
Localización	Intestino delgado y riñón	Riñón	Neuronas colinérgicas del intestino delgado, uniones neuromusculares
Sustratos	Glucosa o galactosa	Glucosa	Glucosa o galactosa
Afinidad por glucosa	Alta	Baja	Baja
Capacidad de transporte de glucosa	Baja	Alta	Alta
Función	Absorción intestinal de glucosa y galactosa Reabsorción renal de glucosa	Reabsorción renal de glucosa	Absorción y reabsorción de glucosa

El transporte de glucosa a través de la membrana intestinal se divide en cuatro etapas, mediante cotransporte activo: 1) el acoplamiento de dos iones de  $\text{Na}^+$  se realiza en una región cercana al amino terminal, lo que produce un cambio conformacional que permite el acoplamiento de una molécula de glucosa en la región cercana al carboxilo terminal, 2) transferencia del  $\text{Na}^+$  y de la glucosa hacia la cara citoplasmática del transportador gracias a un segundo cambio conformacional ocasionado por la glucosa y que involucra la rotación y el re-arreglo de la estructura  $\alpha$ -helicoidal del SGLT1, 3) una vez en la cara interna del transportador, la glucosa se disocia del mismo y pasa al citosol para luego expulsar los 2 iones de  $\text{Na}^+$ , restituyendo al transportador a su forma libre de ligando y 4) finalmente, ocurre un cambio de conformación que permite la fijación de otra molécula de glucosa y 2 de  $\text{Na}^+$  en el lado extracelular<sup>36,37</sup>.

El gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  entre la luz intestinal y la célula epitelial se mantiene gracias a la bomba ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  situada en la membrana basolateral, con lo que, 3

iones de  $\text{Na}^+$  se intercambian con 2 iones de  $\text{K}^+$ , para mantener un circuito constante de sodio que impulsa la absorción eficiente de la glucosa<sup>38</sup>.

Por otra parte, la glucosa que se ha acumulado en las células epiteliales se moviliza fuera de la célula mediante los facilitadores del transporte de glucosa (GLUT). Existen diferentes isoformas de los GLUT y cada una de ellas tiene ubicación y características cinéticas propias (Tabla 2) adaptadas a las necesidades metabólicas de los distintos tejidos del organismo. Para que sea posible el ingreso de la glucosa, primero se deben formar uniones débiles (tipo puentes de hidrógeno) entre los grupos hidroxilo y carbamino del GLUT y los grupos hidroxilos de la glucosa. Los transportadores GLUT 2 Y GLUT 4 han sido los más estudiados, siendo GLUT 2 las únicas proteínas facilitadoras con afinidad hacia los 3 sustratos monosacáridos: glucosa, fructosa y galactosa, se expresa en células pancreáticas, en el hígado, en el riñón y en la membrana basolateral del intestino delgado<sup>24,38</sup>. A diferencia del GLUT 2, el GLUT 4 presenta una alta afinidad por la glucosa y se encuentra expresado en aquellos tejidos sensibles a la insulina como el músculo esquelético, el tejido adiposo o el corazón<sup>27</sup>.

**Tabla 2. Características de los transportadores de monosacáridos**

<b>Isoformas</b>	<b>Monosacárido transportado</b>	<b>Localización en los tejidos</b>	<b>Función</b>
GLUT 1	Glucosa y galactosa	Eritrocito, barrera hematoencefálica, placentaria y de la retina	Ingreso basal de glucosa
GLUT 2	Glucosa, Galactosa y fructosa	Células $\beta$ pancreáticas, hígado, intestino delgado, nefrona proximal	Sensor de glucosa en páncreas, transporta glucosa en la membrana basolateral del intestino y riñón
GLUT 3	Glucosa y galactosa	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón	Ingreso basal de glucosa
GLUT 4	Glucosa	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT 5	Fructosa	Yeyuno, espermatozoides, riñón, células de la microglía	Transporte de fructosa
GLUT 6	Glucosa	Cerebro, bazo y leucocitos	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT 7		No existe	
GLUT 8	Glucosa	Testículos y placenta	Ingreso de glucosa
GLUT 9	Glucosa	Riñón e hígado	Ingreso de glucosa
GLUT 10	Glucosa	Hígado y páncreas	Ingreso de glucosa
GLUT 11	Glucosa	Músculo esquelético y corazón	Ingreso de glucosa
GLUT 12	Glucosa	Músculo esquelético, tejido adiposo e intestino delgado	Ingreso de glucosa
GLUT 13	Glucosa	Cerebro	Ingreso de glucosa y mionositol

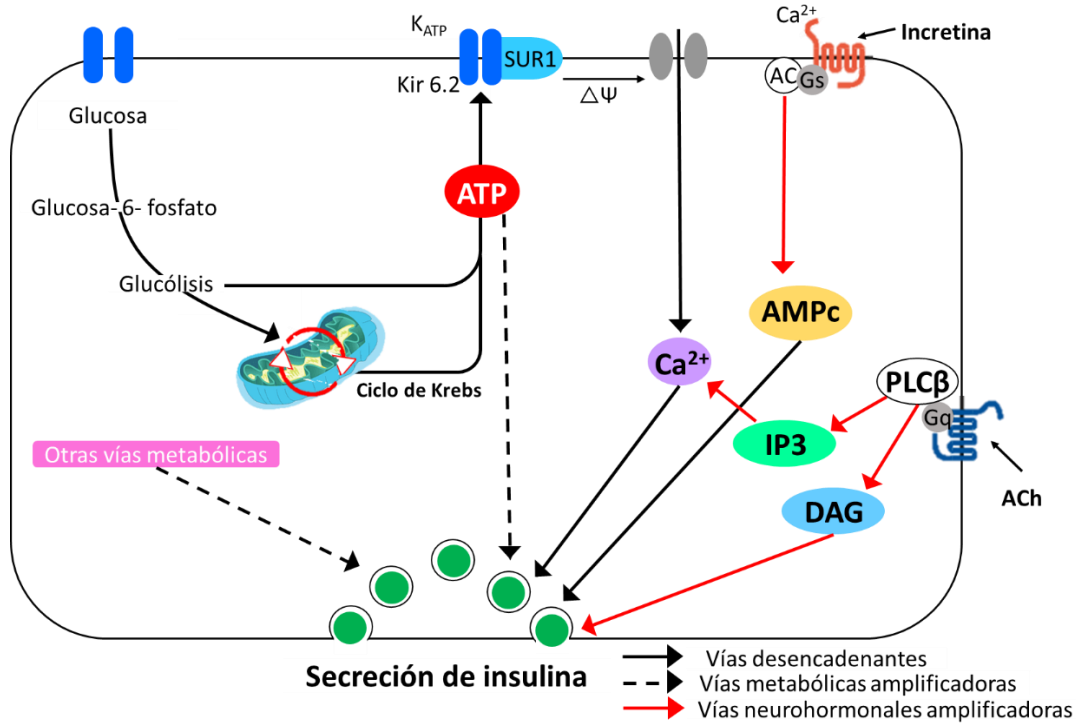
Cuando la glucosa se encuentra dentro de los enterocitos, proteínas de transporte y enzimas facilitan la difusión de glucosa hacia el espacio paracelular a través de la membrana basolateral, para que los monómeros de glucosa puedan pasar a circulación sistémica y ser transportada al interior de las células  $\beta$  del páncreas, y así, para activar eventos de señalización de insulina<sup>24</sup>.

#### **1.4.4 Secreción de insulina inducida por glucosa**

Los eventos moleculares que controlan la secreción de insulina estimulada por glucosa inician cuando el GLU2 pancreático censa que se produjo un incremento de glucosa en la circulación lo que inicia el transporte de glucosa hacia el interior de la célula  $\beta$  a través del GLUT2 (Figura 4). Una vez en el interior de las células  $\beta$ , la glucosa es fosforilada con rapidez a glucosa-6-fosfato por acción de la glucocinasa (GCK; hexocinasa IV); esta fosforilación es el primer paso de la vía glucolítica y el paso limitante de la velocidad en el metabolismo de la glucosa en la célula  $\beta$ . La activación de la glucólisis produce cambios en la relación de NADPH/NADP<sup>+</sup> y la producción de ADP/ATP. El incremento de ATP inhibe los canales de K<sup>+</sup> sensibles a ATP (Canales K<sub>ATP</sub>), evitando la hiperpolarización y favoreciendo la despolarización de la membrana celular<sup>39,40</sup>.

Esta despolarización de membrana favorece la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje que induce a la entrada e incrementó de las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El calcio, produce la activación de fosfolipasa C, que desdobla los fosfolípidos de membrana fosfatidil inositol 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol. El IP3 se une a sus receptores ubicados en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Esto activa cascadas de señalización que resulta en la liberación de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma y aumenta aún más la concentración intracelular de calcio<sup>41</sup>. Esto induce a la activación de diversas proteínas como la sinaptotagmina, que participa en la movilización de las vesículas de almacenamiento de insulina a la membrana de la célula para que se lleve a cabo la exocitosis de insulina de las vesículas de almacenamiento. Una vez liberada, la insulina puede unirse a sus receptores ubicados en el hígado, músculo y tejido adiposo, para activar cascadas de señalización que

resultan en la captación de glucosa y en la consecuente disminución de la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo<sup>39,40</sup>.

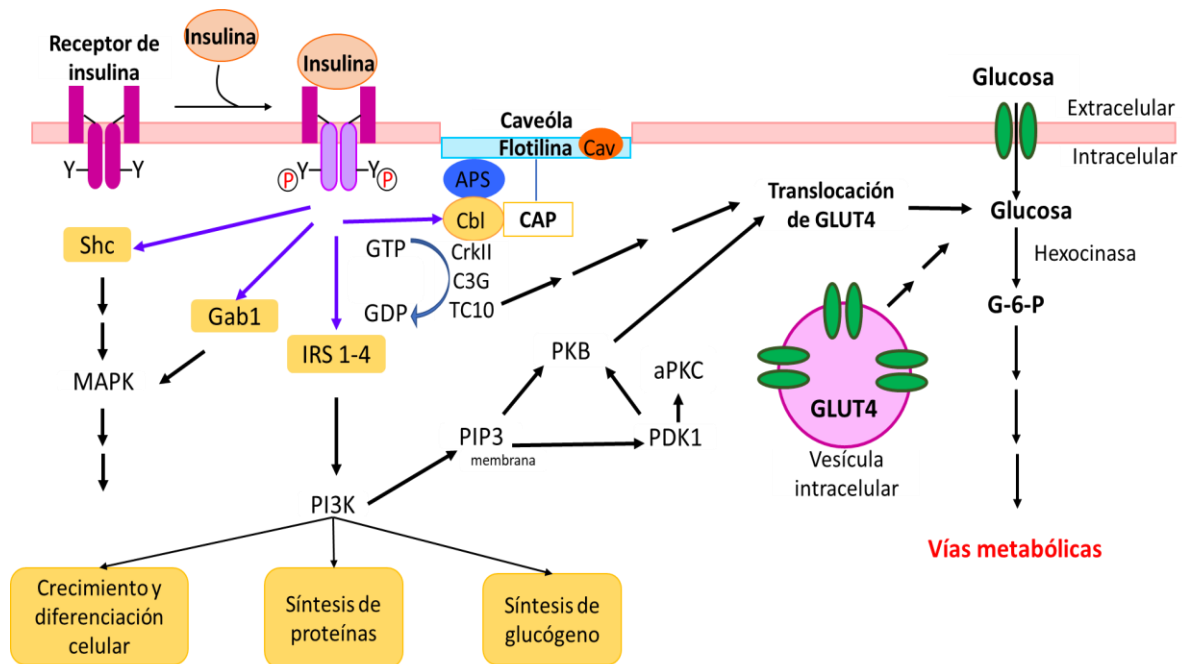


**Figura 4. Secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas inducidas por glucosa.** La glucosa al entrar al interior de las células sufre fosforilación por acción de la glucocinasa y su metabolismo aumenta las concentraciones de ATP (relación ATP/ADP), inhibiendo los canales de  $K^+$  sensibles a ATP ocasionando despolarización de la membrana, ocasionando la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VDCC), lo que permite la entrada de calcio, incrementando los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular y como consecuencia la exocitosis de insulina de las vesículas de almacenamiento. La secreción de insulina también es amplificada por hormonas y neurotransmisores que general señales intracelulares como cAMP, DAG e  $IP_3$  (modificada de Seino,2012)<sup>42</sup>.

#### 1.4.4.1 Cascada de señalización del Receptor de insulina

El receptor de insulina es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades extracelulares  $\alpha$  y dos subunidades transmembrana  $\beta$  unidas por puentes disulfuro, que cuando se activa tiene actividad intrínseca de tirosina cinasa. La subunidad  $\alpha$  inhibe la actividad intrínseca de tirosina cinasa de las subunidades  $\beta$ . Cuando la insulina se une a las subunidades  $\alpha$ , se forma una glucoproteína heterotetramérica y se produce la transfosforilación de las subunidades  $\beta$ .

La autofosforilación activa el dominio tirosina-quinasa del receptor debido a una serie de alteraciones en la subunidad  $\beta$  que facilita la unión de ATP<sup>42</sup>. Esta activación de los receptores de insulina inicia la señalización al fosforilar un grupo de proteínas intracelulares como los sustratos de receptores de insulina (IRS, *insulin receptor substrates*) y proteínas transformadoras que contienen el dominio de homología-2-Src (Shc, *Src-homology-2-containing protein*), estos sustratos interactúan con efectores que amplifican y extienden la cascada de señalización que incluye MAPK y ERK, los cuales participan en la transcripción génica mediada por insulina y en el crecimiento celular (Figura 5)<sup>43</sup>.



**Figura 5. Vías de señalización del receptor de insulina.** La unión de la insulina activa la actividad intrínseca de tirosina cinasa del receptor de insulina, dando lugar a la fosforilación de la tirosina (Y-P) de las subunidades  $\beta$  del receptor y de proteínas que actúan como sustratos específicos (amarillo) del receptor de insulina: Gab-1 y Shc. En la membrana una reserva caveolar de receptor de insulina fosforila a la caveolina (Cav), APS y Cbl. Estas proteínas fosforiladas interactúan con la cascada de señalización a través de los dominios SH2 y SH3 para mediar los efectos de la insulina. En los tejidos en que la insulina ejerce sus efectos, como el músculo estriado y adipocito, un acontecimiento fundamental es la translocación del transportador GLUT4 de glucosa de las vesículas intracelulares a la membrana plasmática; esta translocación es estimulada por vías caveolares y no caveolares. APS, adaptador de proteína con PH y dominios SH2; CAP, proteínas asociada a Cbl; CAV, caveolina; CrkII, regulador de la cinasa II; elementos de unión asociado Gab-1, Grb-2; PDK, cinasa dependiente de fosfoinositida; Y-P, residuo fosforilado de tirosina (Tomada de Bruton, 2006)<sup>28</sup>.

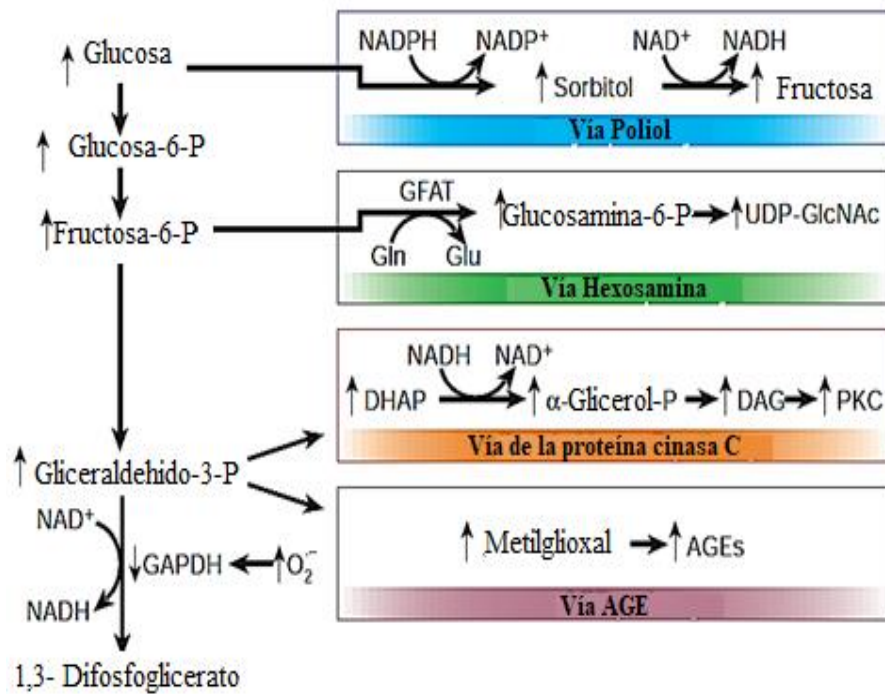
La acción de la insulina para el transporte de glucosa depende de la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), que es activada por la interacción con proteínas IRS y genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual regula la ubicación de actividad de varias cinasas que incluyen a Akt e isoformas atípicas de la proteína cinasa C (PKC). Se ha descrito que la Akt2 controla pasos importantes en la captación de glucosa en el hígado, mientras que sus sustratos, junto con las proteínas Rac y TC10, coordinan la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática a través de un proceso en el que participan la remodelación de actina<sup>44</sup>.

Finalmente, una vez que los receptores GLUT 4 se encuentran en la membrana plasmática por acción de la insulina, estos transportadores permiten el paso de la glucosa al interior de la célula por transporte facilitado<sup>18</sup>. Después de la difusión facilitada al interior de las células siguiendo un gradiente de concentración, la glucosa sufre fosforilación por acción de hexocinasa. La hexocinasa II o glucocinasa se encuentra en asociación con GLUT4 en tejidos adiposo, músculo estriado y cardíaco. Al igual que GLUT4, la hexocinasa II es regulada por la insulina a través de la transcripción. La G6P es un sustrato que puede entrar a varias vías. Por ejemplo, puede ser isomerizado a Glucosa-1-fosfato por acción de la fosfoglucomutasa y para almacenarse como glucógeno (la insulina incrementa la actividad de la glucógeno sintasa). Por otro lado, la G6PD puede entrar a la vía glucolítica para la producción de ATP; o bien puede entrar a la vía de las pentosas-fosfato<sup>37</sup>. Cuando existen alteraciones en cualquiera de estas vías de señalización, se desencadenan alteraciones bioquímicas importantes.

### **1.5 Alteraciones bioquímicas inducidas por hiperglucemia crónica.**

En los tejidos que no requieren de la insulina para la captación de glucosa y que contienen la enzima aldosa reductasa (riñón, tejido nervioso y vascular), el flujo de este monosacárido al interior de las células se encuentra limitado en condiciones de normo glucemia. Sin embargo, cuando la hiperglucemia se manifiesta debido a la ausencia de insulina, el metabolismo de la glucosa se desvía de las vías insulino-dependientes a las no insulino-dependientes provocando una sobrecarga de sustratos en estas últimas<sup>45</sup>.

Lo anterior se encuentra mediado por la saturación de la glucólisis y sus intermediarios enzimáticos e incitando a la sobre activación de cuatro vías principales (Figura 6): 1) la vía de los polioles<sup>46</sup>, 2) la formación de los productos terminales de glucosilación avanzada (AGEs)<sup>47</sup>, 3) la activación de isoformas de la Proteína Cinasa C (PKC)<sup>12</sup> y 4) activación en la vía de las hexosaminas<sup>48</sup>. La sobre activación induce cambios en la función celular tales como estrés osmótico, modificación postraduccional de múltiples proteínas y sus receptores; estrés oxidativo y la activación de factores proinflamatorios que acentuarán el daño a los tejidos<sup>23,48,49</sup>.



**Figura 6. Activación de las diversas vías metabólicas por hiperglucemia y saturación de la glucólisis.** En la DM, la hiperglucemia crónica provoca complicaciones en distintos órganos. En esta condición aumentan las especies reactivas de oxígeno como resultado de su autooxidación, lo que propicia la acumulación de metabolitos como la fructuosa, el sorbitol y las triosas fosfato. También, hay aumento de la síntesis de diacilgliceroles a partir de las triosas fosfato, las cuales activan a la proteína cinasa C. Finalmente, estas desregulaciones metabólicas causan alteración en la transducción de la señal, en la expresión anormal de genes, además, de daño tisular, lo que propicia complicaciones en los pacientes con diabetes (Tomado de Brownlee, 2001)<sup>50</sup>.

### **1.5.1 Incremento en la actividad de la vía de los polioles.**

Durante la activación de esta vía existe un desbalance de NADPH/NADP<sup>+</sup>, mismo que afecta la actividad de otras enzimas como la NADPH oxidasa, la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) y la Glutación Reductasa (GR), que se encuentran involucrados directamente en los mecanismos antioxidantes en respuesta a especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo y peróxidos orgánicos e inorgánicos); en consecuencia, la falta de NADPH favorece el estrés oxidativo de los pacientes diabéticos<sup>51,45</sup>.

### **1.5.2 Activación de la vía de las hexosaminas.**

La activación de esta vía en la diabetes mellitus se ha relacionado con la estimulación de la expresión de genes como los del TGF- $\alpha$ , de TGF- $\beta$ 1 y del PAI-1, que se encuentran estrechamente relacionados con los problemas de cicatrización y la aparición de resistencia insulínica<sup>45</sup>.

### **1.5.3 Activación de la proteína cinasa C (PKC).**

La activación de la PKC tiene efectos en la expresión genética, produciendo un decremento en los factores necesarios para la función normal de la célula. Un ejemplo es la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) que estimula la expresión de la endotelina (ET-1) y conduce a una disminución del flujo sanguíneo. Por otro lado, la activación de PKC aumenta factores que producen daño vascular como: el factor endotelial, inducción de la expresión del gen del factor promotor de la permeabilidad (VEGF), TGF  $\beta$ , fibronectina, inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) encargado de la degradación de fibronectina, NF-kB y NADPH oxidasas<sup>45,52,53</sup>.

### **1.5.4 Acumulación de productos terminales de glucosilación avanzada (AGEs)**

La acumulación de los AGEs ocurre con mayor frecuencia en las proteínas estructurales de la matriz extracelular (MEC) como fibrina, en los diferentes tipos de colágeno. Aunado a este hecho se ha asociado una modificación de integrinas ( $\alpha$ 2  $\beta$ 1), importantes durante la

migración de queratinocitos en el cierre de la herida<sup>54</sup>. La acumulación de AGEs en las proteínas tisulares se asocia con las complicaciones micro y macrovasculares diabéticas, tales como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía. En la nefropatía diabética, los AGEs contribuyen al desarrollo y progresión de esta<sup>54,55</sup>.

Las alteraciones metabólicas inducidas por la hiperglucemia en conjunto intervienen en el desarrollo de diversas complicaciones y enfermedades debido a que inducen, por las alteraciones en los factores de crecimiento, quimiocinas y citoquinas, discapacidad a las personas que la padecen desencadenando neuropatía diabética, daño en la retina, el riñón y el músculo. Dentro de las complicaciones características de las personas que cursan con Diabetes mellitus, prevalece la angiopatía diabética que se manifiesta con el deterioro de la cicatrización de los tejidos, particularmente de úlceras en extremidades inferiores y en la mucosa bucal, perpetuación de la inflamación e hipertensión.

## **1.6 Complicaciones de la diabetes**

Las complicaciones de la diabetes son producto de la hiperglucemia crónica y, se han clasificado en agudas y crónicas. La primera se expresa como consecuencia de un desbalance osmolar en la concentración sérica de la glucosa y una alteración electroquímica producida por cetoacidosis<sup>51</sup>. Por otra parte, las complicaciones crónicas se clasifican en micro y macrovasculares de acuerdo con el calibre del vaso que sea afectado. Las complicaciones microvasculares dan lugar a nefropatía y retinopatía diabética como efecto del engrosamiento de las membranas basales de los capilares. Las complicaciones macrovasculares incluyen trastornos caracterizados por aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón. Estas, complicaciones son una de las principales causas de muerte en pacientes diabéticos<sup>51,56,50</sup>.

### **1.6.1 Complicaciones agudas**

La cetoacidosis diabética (CAD) y el estado hiperosmolar hiperglucémico (EHH) son dos desequilibrios metabólicos agudos que se manifiestan debido a la deficiencia de insulina e hiperglucemia intensa (> 250 mg/dL). La CAD es una de las complicaciones metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia, hipercetonemia y acidosis metabólica. El mecanismo subyacente a la cetoacidosis es influenciado por la deficiencia de insulina, junto a un aumento

de hormonas contrarreguladoras como el glucagón, cortisol, las catecolaminas y la hormona de crecimiento. El descenso de la proporción entre la insulina y el glucagón, combinando con la elevación de catecolaminas y hormona de crecimiento, aumenta la lipólisis y liberación de ácidos grasos; siendo la cetoacidosis el resultado del desplazamiento de los ácidos grasos libres procedentes de los adipocitos hacia el metabolismo hepático<sup>57</sup>.

El EHH se caracteriza por hiperglucemia, hiperosmolaridad y deshidratación sin cetoacidosis significativa. En pacientes diabéticos con un tratamiento inadecuado, se genera hipertonicidad extracelular por pérdida de líquidos y por acumulación extracelular de glucosa (hiperglucemia) induciendo glucosuria y diuresis osmótica, provocando la disminución del volumen intravascular y un desbalance hidro-electrolítico que puede desmineralizar y deshidratar al paciente<sup>58</sup>.

## **1.6.2 Complicaciones crónicas**

Las complicaciones crónicas están relacionadas principalmente con daño al endotelio y músculo liso de la microvasculatura y se manifiesta como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética. El aumento de estas complicaciones se correlaciona en la mayoría de los casos con la severidad y duración de la hiperglucemia crónica<sup>51</sup>.

### **1.6.2.1 Microvasculares**

Uno de los cambios estructurales que se exhiben en la microangiopatía diabética es engrosamiento de la membrana basal de los capilares sanguíneos que ocasionan angiopatía oclusiva e hipoxia tisular. Estos cambios en la estructura de los capilares generan un daño endotelial producido por la esclerosis microvascular, alterando la permeabilidad vascular, aumenta la viscosidad sanguínea y presión intravascular, reduciendo la respuesta reguladora de vasodilatación microvascular<sup>59</sup>.

#### **1.6.2.1.1 Retinopatía**

La retinopatía diabética (RD) es un desorden vascular que afecta la microcirculación de la retina. El desarrollo de esta patología se relaciona con la severidad de la hiperglucemia y la presencia de hipertensión. Se presenta tanto en la DMT1 y DMT2, y se estima que el 4% de

la población diabética mayor de 40 años la padece<sup>12</sup>. La RD se clasifica en No proliferativa (RDNP) y proliferativa (RDP). La primera se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular de severidad variable y la formación de micro aneurismas en los capilares de la retina. Por su parte, la RDP ocurre como un desarrollo cada vez más grave de la RDNP<sup>59</sup>.

Existen varios mecanismos patológicos propuestos por los cuales la diabetes puede conducir al desarrollo de retinopatía. En el caso del lente cristalino, la membrana es impermeable al sorbitol lo que trae como consecuencia un aumento en la osmolaridad del medio, permitiendo la entrada de líquido al tejido del lente cristalino, ocasionando opacidad y finalmente retinopatía diabética<sup>59,60</sup>. Otro de los mecanismos involucrados es el incremento del estrés oxidativo debido a los niveles altos de glucosa que estimulan la producción de radicales libres y la formación de especies reactivas de oxígeno<sup>61</sup>.

#### **1.6.2.1.2 Nefropatía**

La nefropatía es un síndrome progresivo causado por angiopatía capilar de los glomérulos renales que afecta del 20-30% de los pacientes con DM<sup>57</sup>. Es una complicación tardía que se presenta en pacientes diabéticos con una evolución aproximada de 15 años. Los cambios tempranos se manifiestan por el engrosamiento de la membrana basal del glomérulo renal, como consecuencia del aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágena tipo IV) y de PAI-1<sup>59</sup>. La proteinuria, la hiperglucemia junto con la angiotensina II (ATII) y TGF- $\beta$  participan en la estimulación de la fibrosis. La angiotensina II estimula el crecimiento renal y la fibrosis mediante los receptores ATI, mismos que sobre regulan secundariamente a TGF- $\beta$  involucrado en la expansión de la matriz mesangial y en la hipertrofia renal<sup>57</sup>. Por otro lado, la unión de AGEs a proteínas renales y circulantes forman complejos de unión cruzada con receptores de AGEs, lo que conduce a hipertrofia glomerular y glomerulosclerosis.

#### **1.6.2.1.3 Neuropatía**

La neuropatía diabética es una complicación sintomática que afecta aproximadamente al 60 % de los pacientes, se produce como consecuencia de la disfunción de los nervios periféricos; y se presenta con más frecuencia en pacientes con DMT2. La neuropatía diabética incluye

un grupo de síndromes clínicos que involucran tanto a nervios periféricos, somáticos y autonómicos. En las células nerviosas, las alteraciones producidas a través de los mecanismos moleculares inducidos por hiperglucemia (vía del poliol, incremento en la formación intracelular de AGEs, y activación de la PKC) convergen en el incremento de la actividad de la cadena de transporte de electrones y la sobreproducción de ROS, que asociadas al daño de las células endoteliales conducen a un riesgo potencial de sufrir lesiones en los pies y el desarrollo de úlceras de pie diabético<sup>51,60</sup>.

La glucosilación de las proteínas neurales a nivel de los nervios periféricos, producen cambios estructurales en la mielina que es identificada por macrófagos, produciendo una desmielinización segmentaria a través de digestión. La glucosilación también afecta a otras proteínas del citoesqueleto axonal, como tubulina, neurofilamentos y actina, que una vez alteradas resultan en el enlentecimiento de la conducción, atrofia y degeneración axonal<sup>62</sup>. Por otra parte, la activación de la vía del poliol conduce a la acumulación intracelular de sorbitol y fructuosa modificando la osmolaridad intracelular, que inhibe la síntesis de mionositol, La disminución del mionositol en el nervio ocasiona el decremento de la velocidad de conducción nerviosa y la aparición de la neuropatía diabética<sup>60</sup>.

### **1.6.2.2 Macrovasculares**

Las complicaciones macrovasculares manifestadas clínicamente como cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, enfermedad vascular cerebral y la insuficiencia arterial periférica, son la principal causa de muerte en un 70-80% en pacientes diabéticos. Se ha sugerido que la existencia de mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares es consecuencia de la resistencia a la insulina, estado en el cual existe un notable aumento de la sobreproducción de ROS en las células endoteliales debido al incremento en el flujo de ácidos grasos libres de los adipocitos<sup>63</sup>. Las complicaciones macrovasculares como la enfermedad arterial periférica y la isquemia coronaria progresan con la evolución de la diabetes. Los cambios en el endotelio, las alteraciones cualitativas y cuantitativas de lípidos, cambios en la glucosilación y glucooxidación, alteran la función plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis, acelerando la arteroesclerosis y la trombosis en pacientes diabéticos<sup>60,63,64</sup>.

La enfermedad vascular periférica en la diabetes afecta principalmente a las arteriolas. Los factores de riesgo potenciales incluyen niveles elevados de proteína C reactiva, fibrinógeno, homocisteína, apolipoproteína B, lipoproteína a (Lpa) y viscosidad del plasma, también afectados por la arterioesclerosis, mostrando engrosamiento de la membrana basal capilar. El estrechamiento de la luz arteriola a menudo conduce a la isquemia tisular causando ulceración y gangrena de las extremidades inferiores<sup>64</sup> que dificultan o impiden el proceso de cicatrización.

Actualmente, los medicamentos más frecuentemente utilizados como tratamiento para la DM2 pueden clasificarse en agentes que mejoran la secreción de insulina (secretagogos como las sulfonilureas (SU) y los miméticos de incretina), aquellos que sensibilizan los órganos diana de la insulina (por ejemplo, la metformina de la clase de biguanidas o tiazolidinedionas), inhibir la digestión de carbohidratos (inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa gastrointestinal) o la absorción intestinal (inhibidores del cotransportador sodio/glucosa SGLT). Diferentes terapias abordan diferentes complicaciones y etapas de la DM2 y pueden prescribirse en combinación para ejercer efectos sinérgicos.

### **1.7 Tratamiento de la diabetes**

La declaración por consenso de la *American Diabetes Association* señala que el tratamiento estándar en pacientes diabéticos incluye el control intensivo de la glucemia, otros aspectos fundamentales son una dieta adecuada y ejercicio. Desde el punto farmacológico, las aproximaciones existentes incluyen insulina exógena y una serie de fármacos con diferentes perfiles farmacodinámicos que disminuyen los niveles de hiperglucemia posprandial, y a los que en conjunto se les denomina hipoglucemiantes.

El objetivo de los fármacos hipoglucemiantes existentes es disminuir y mantener dentro de los límites deseados las concentraciones de glucosa. Además, se buscan beneficios adicionales como prevenir la aparición o progresión de las principales complicaciones<sup>60</sup>. La clasificación actual de la diabetes mellitus permite identificar a un grupo de personas que prácticamente no secretan insulina y cuya estabilidad depende de la administración de la hormona exógena. De un 5 a 10% de la población diabética pertenece el grupo

insulinodependiente (tipo 1) en Estados Unidos. Casi todos los diabéticos tipo 2 no necesitan insulina exógena para sobrevivir, sin embargo, requieren de complementación exógena además de la secreción endógena, para obtener un estado óptimo.

Actualmente, existen una gran diversidad de medicamentos con diferentes perfiles farmacodinámicos que se dirigen a bajar los niveles de hiperglucemia posprandial, en la Tabla 3 se describen la insulina y sus análogos, así como las seis categorías de fármacos hipoglucemiantes; secretagogos de insulina (sulfonilureas, meglitinidas, derivados de D-fenilalanina, biguanidas, tiazolidinedionas), inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, inhibidores del cotransportador sodio-glucosa, tratamientos basados en incretina y un análogo, la amilina<sup>65</sup>.

**Tabla 3. Fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la diabetes mellitus<sup>66</sup>.**

Fármacos	Mecanismo de acción	Efectos adversos
<b>Análogos de insulinas</b> - <b>Acción rápida:</b> Lispro, aspartato y glulisina - <b>Acción corta:</b> regular - <b>Acción intermedia:</b> NPH - <b>Larga acción:</b> Glargina y degludec	Activan el receptor de insulina Estimulan el transporte y la oxidación de glucosa, glucógeno, lípidos, síntesis proteínica y regulación de la expresión génica.	Hipoglucemia, aumento de peso y rara vez lipodistrofia
Fármacos orales reductores de glucosa		
<b>Inhibidores de la <math>\alpha</math>-glucosidasa</b> - Acarbosa - Miglitol - Voglibosa	Inhiben las enzimas $\alpha$ -glucosidasas del intestino. Aminoran la hiperglucemia posprandial	Flatulencias, falla hepática
<b>Inhibidores de los SGLT<sub>2</sub></b> - Canagliflozina - Dapagliflozina - Empagliflozina	Previene la reabsorción de la glucosa renal en el intestino y túbulos renales, favoreciendo su excreción.	Infecciones genitales y urinarias, poliuria, prurito, sed, diuresis, estreñimiento.
<b>Biguanidas</b> - Metformina	Activa la proteína la proteína cinasa activada por AMP, disminuyendo la gluconeogénesis en hígado y riñones	Acidosis láctica, insuficiencia cardiaca congestiva.

*Continúa tabla 3...*

<p><b>Inhibidores de la dipeptidil peptidasa</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sitagliptina</li> <li>- Saxagliptina</li> <li>- Linagliptina</li> <li>- Alogliptina</li> <li>- Vildagliptina</li> </ul>	<p>Prolongar la acción del GLP-1; promueve la secreción de insulina Reduce los niveles de glucagón, retarda el vaciamiento gástrico, disminuye el Apetito</p>	<p>Rinitis, infecciones respiratorias, dolores de cabeza, pancreatitis, raras reacciones alérgicas.</p>
<p><b>Sulfonilureas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glipizida</li> <li>- Glibenclamida</li> <li>- Glimpirida</li> </ul>	<p>Inhiben la apertura de los canales de potasio en las células <math>\beta</math>, por lo que intensifican la liberación de insulina Incrementan la formación de glucógeno, grasa y proteínas.</p>	<p>Hipoglucemia Aumento de peso Reacciones cutáneas Disfunción hepática Insuficiencia renal</p>
<p><b>Glitínidas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Repaglinida</li> <li>- Nateglinida</li> </ul>	<p>Modulan la liberación de insulina por las células <math>\beta</math> al regular la salida de potasio a través de los conductos de este ion. Incrementa la formación de glucógeno, grasa y proteína.</p>	<p>Hipoglucemia</p>
<p><b>Tiazolidinedionas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rosiglitazona</li> <li>- Pioglitazona</li> </ul>	<p>Regulan la expresión génica al fijarse a PPAR-<math>\gamma</math> y a PPAR-<math>\alpha</math>, disminuyendo la resistencia a la insulina</p>	<p>Retención de líquidos, aumento de peso, edema macular y anemia.</p>
<p><b>Agonistas de GLP-1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Albiglutida</li> <li>- Dulaglutida</li> <li>- Exenatida</li> <li>- Liraglutida</li> </ul>	<p>Bloquea la degradación de GLP y aumenta las concentraciones circulantes del péptido 1-glucocanoide. Disminuye las oscilaciones de la glucemia posprandial; incrementa la liberación de insulina mediada por glucosa, disminuye las concentraciones de glucagón; lentifica el vaciamiento gástrico/ estomacal y disminuye el apetito.</p>	<p>Náusea, cefalea, vómitos, anorexia, disminución leve de peso, pancreatitis.  Rinitis e infecciones de vías respiratoria altas.</p>
<p><b>Análogo de amilina</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pramlintida</li> </ul>	<p>Disminuyen las oscilaciones de glucemia posprandial y disminuye las concentraciones de glucagón. Lentifica el vaciamiento gástrico y disminuye el apetito.</p>	<p>Náuseas, anorexia, hipoglucemia y cefalea.</p>

Debido a que la DMT2 y sus complicaciones, siguen apareciendo y avanzando de manera acelerada, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos medicamentos contra la diabetes que sean más efectivos y con menos efectos secundarios.

## 2.0 ANTECEDENTES

Diferentes publicaciones han evidenciado el potencial de algunos compuestos de coordinación sobre la regulación sistémica de glucosa. Estos compuestos de manera regular están formados por la interacción de un átomo central (un ion metálico con orbitales de valencia que puede actuar como un ácido de Lewis) y una o varias bases de Lewis con pares de electrones libres, que se conocen como agentes acomplejantes o ligandos, las interacciones entre ambos llevan a la formación de un enlace covalente coordinado<sup>67,68</sup>.

Niu (2017) describe el papel de compuestos coordinados de vanadio como un agente potenciador de insulina, mejorando la tolerancia a la glucosa y reduciendo el daño hepático inducido por la hiperglucemia, estos efectos se encontraron asociados a una mejor expresión del PPAR  $\alpha/\gamma$  en adipocitos y la activación de Akt/ PKB en adipocitos e hígado<sup>69</sup>. Después, Tsave (2018) describió que en adipocitos maduros la exposición *in vitro* de compuestos coordinados de Zinc y Vanadio (25  $\mu\text{M}$ ), mejoran las señales de respuesta adipogénica igual e incluso mejor que la insulina, aumentado la expresión de los transportadores de glucosa, 1,3 y 4 (GLUT 1,3,4), receptor de insulina (INSR), la adiponectina, glucoquinasa (GCK) y el receptor gamma PPAR  $\gamma$ , contribuyendo a la maduración funcional del tejido adiposo y favoreciendo la regulación de la glucosa<sup>70,71</sup>. Por su parte, Conconi (2003), sugiere que el efecto hipoglucemiante de estos compuestos se debe a que ejercen efecto sobre la secreción de insulina e involucra la activación de los canales de calcio<sup>72</sup>.

Otro grupo de compuestos coordinados de Zinc, han demostrado efectos sobre la regulación de la glucosa, bajo diferentes mecanismos. Philip (2017), demostró que estos compuestos tienen la capacidad de inhibir competitivamente a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas (0.1 a 0.3 mM) y  $\alpha$ -amilasas (0.3 a 0.4 mM), presuntamente por unión de los átomos de oxígeno de los compuestos con el sitio catalítico de la enzima<sup>73</sup>. Por otro lado, Takayuki (2018), describió el potencial de compuestos coordinados de zinc con ligandos de selenio como agentes hipoglucemiantes, la evaluación *in vitro* e *in vivo* (20  $\mu\text{M}$ ) en ratones normoglucémicos y diabéticos demostraron que estos compuestos actúan como miméticos de insulina y que además mejoran la hipertrofia en páncreas<sup>74,75</sup>.

Kovalska (2018), describió que compuestos coordinados de vanadio tienen la capacidad de unirse a residuos de aminoácidos de la insulina como la histidina y tirosina (H10 y Y16) inhibiendo la agregación de fibrillas amiloides<sup>76</sup>, esta misma actividad la reportó Gong (2018) pero para complejos de Rutenio -platino, mejorando la hipertrofia del páncreas<sup>77</sup>. Mientras que, Ming (2018) también reportó que complejos de magnesio, actúan como inhibidores competitivos de la dipeptidil peptidasa IV<sup>78</sup>.

## 2.1 Casiopeínas

Las Casiopeínas son un grupo de compuestos de coordinación constituidos por un átomo central de cobre (Cu II) unido a ligandos orgánicos. La fórmula general condensada de las Casiopeínas es:  $[Cu(NN)(ON)]NO_3$  o  $[Cu(NN)(OO)]NO_3$ <sup>79</sup>(Figura 7).

Donde

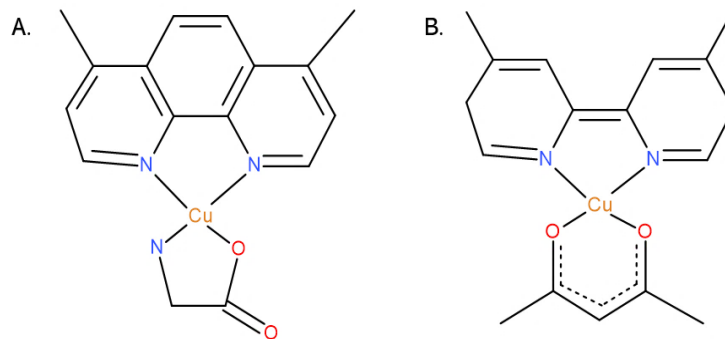
(N-N) = ligando del tipo diimina (fenantrolinas o bipyridinas sustituidas)

(N-O) = ligandos aminoácidos o péptidos

(O-O) = ligando donador (acetilcetonato o salicialdehidato)

La naturaleza, número, posición y carga de los sustituyentes en el ligando diimina son los principales responsables de la modulación de su reactividad, biodistribución y transporte, mientras que los ligantes N-O y O-O contribuyen en menor medida en la selectividad de la molécula, y en la variación de su actividad biológica. Por lo tanto, el cobre puede participar en procesos redox y disminuir de manera importante la toxicidad de los fármacos, debido a que los organismos tienen procesos homeostáticos para regular el exceso de este elemento.

Dado que el cobre es un metal de transición biológicamente esencial, se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tejidos como parte de diferentes metaloenzimas, como citocromo c oxidasa, lisil oxidasa, la superóxido dismutasa, tirosina y dopamina  $\beta$ -monoxigenasa. Estas enzimas se encuentran involucradas en una gran variedad de reacciones metabólicas como la utilización de oxígeno y producción de energía<sup>80,81,82</sup>.



**Figura 7. Estructura general de las Casiopeínas.** Se pueden dividir en dos grupos: A) las que tienen como ligando primario una fenantrolina y B) o una bipyridina, ambos grupos pueden tener como ligando secundario un aminoácido, acetilacetonato o un salicialdehidato. (Adaptada de Gómez, 2009).

### 2.1.2 Actividad antitumoral de las Casiopeínas

Diferentes ensayos han sugerido que estos compuestos son capaces de inhibir la proliferación y producir la muerte celular de manera dependiente o independiente de la activación de las caspasas, además de otras señales que conducen a este efecto final. Estas señales podrían estar mediadas por la generación de ROS, por toxicidad mitocondrial o por interacción directa con el ADN. Los tres mecanismos podrían actuar solos o en cooperación. Los análisis por QSAR (relación cuantitativa de estructura-actividad) apoyan los mecanismos de acción propuestos. Por otro lado, los complejos de cobre se han descrito como agentes de unión, escisión y modificación oxidativa del ADN, siendo éste último el mecanismo crítico para la actividad antitumoral de las Casiopeínas<sup>83</sup>.

Estudios realizados en modelos *in vitro* e *in vivo*, muestran que varios de estos compuestos poseen actividad como agentes antiproliferativos y antitumorales. Los estudios preclínicos en líneas tumorales humanas (carcinoma de ovario humano (CH1), leucemia murina (L1210)<sup>84</sup> y carcinomas cérvico uterinos<sup>83</sup>) han revelado que la sustitución en el ligando de diimina, así como los cambios en el segundo ligando, modifican la magnitud de su efecto antiproliferativo y antitumoral<sup>85,82</sup>. Kachadourian (2010), describe que el compuesto [Cu(4,7-dimetil-1-10-fenantrolina) (glicinato)]NO<sub>3</sub> (Cas II-gly), es capaz de utilizar GSH (glutatión) como fuente de electrones para catalizar una reacción similar a Fenton, causando una sobreproducción de ROS y la despolarización de la membrana en la mitocondria, todo esto

conduce a la disfunción mitocondrial y la muerte celular. El agotamiento de GSG se correlaciona con el efecto antiproliferativo<sup>86</sup> por eliminación de una de las principales defensas antioxidantes. Por otra parte, Becco (2012) bajo la suposición de que las vías metabólicas de los parásitos cineplásticos (*Leishmania* y *Trypanosoma*) son similares a las presentes en las células tumorales, analizó la actividad antitripanosomática de Cas II-gly, [Cu(4,7-dimetil-1-10-fenantrolina) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub> (Cas III-Ea) y [Cu(4,4'-dimetil-2-2'-bipiridina) (acetilacetato)]NO<sub>3</sub> (Cas III-ia), donde los tres complejos mostraron actividad anti - *Trypanosoma. cruzi in vitro* similares a las del fármaco de referencia (Nifurtimox). Además, se demostró que la forma de interacción de las Casiopeínas con el ADN plasmídico es mediante escisión por un mecanismo de radicales libres.

Además, experimentos específicos que exploraban el mecanismo de acción demostraron que los compuestos producen cambios en proteínas estructurales como la tubulina, integrina y fibronectina, direccionando a las células tumorales a muerte por apoptosis. Así mismo, Carvallo (2008), elucidó que Cas III-ia induce apoptosis en células HCT-15 *in vitro* a través de un mecanismo dependiente de caspasas y en experimentos en modelos *in vivo* determina su efecto antitumoral<sup>87</sup>. Cas III-ia, ha completado los ensayos preclínicos y está lista para comenzar los estudios clínicos de fase I<sup>85</sup>. En otro estudio más reciente, Espinal (2016), evidenció la actividad apoptótica de Cas II-gly analizando las respuestas fisiológicas de los cultivos celulares de cáncer cervical. Por su parte, Rodríguez (2016) señala que el daño producido sobre las cadenas de ADN es por roturas monocatenarias<sup>80</sup>. Además de regular negativamente los procesos de transformación en fibroblastos, inhibe la migración incontrolada de células cancerosas y es capaz de aumentar los mecanismos moleculares de protección hepática. Mientras que Marín (2012) señala que esta Casiopeína posee efecto en diferentes dianas; actuando presuntamente sobre la glucólisis y glucógeno, por inhibición de la hexoquinasa, considerando que esta enzima regula los niveles de glucosa-6-fosfato (G6P)<sup>88</sup>. Actualmente, Cas II-gly se encuentra en fase I de ensayos clínicos<sup>89</sup>.

### **2.1.3 Identificación de objetivos secundarios a través de la farmacología de sistemas**

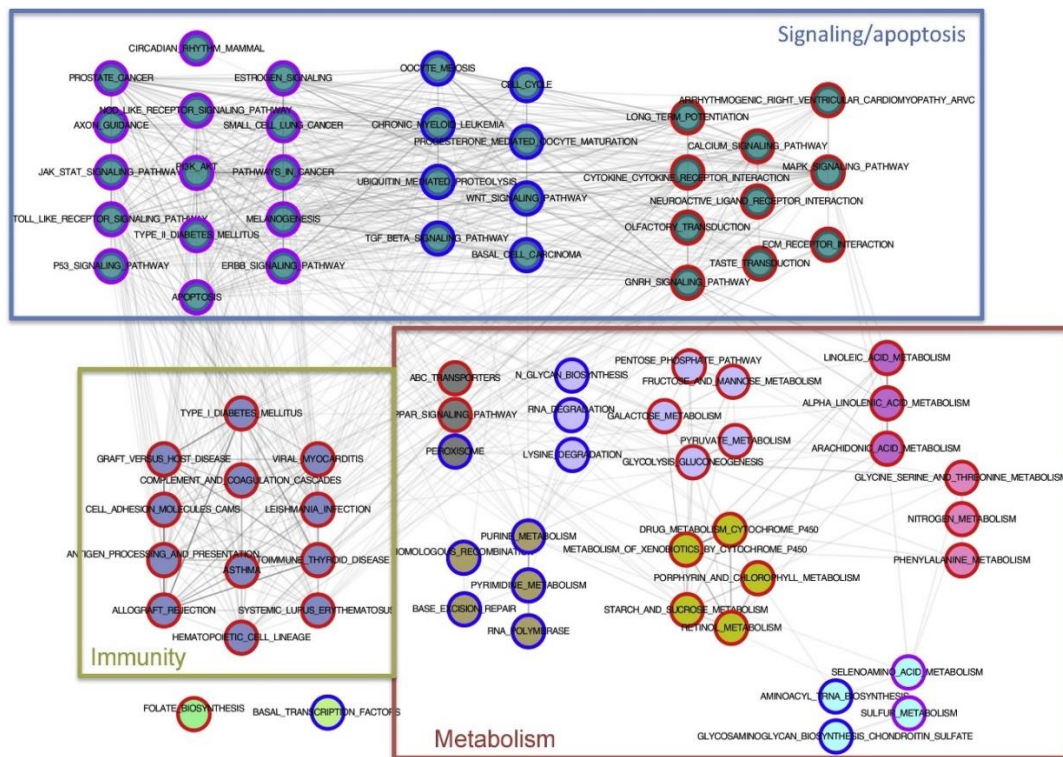
Inicialmente estos compuestos fueron sintetizados con la finalidad de ejercer un efecto citostático y antineoplásico. Sin embargo, los trabajos anteriores no tuvieron en cuenta que las vías no están aisladas, sino que se encuentran conectadas por interacciones moleculares. La comprensión de los mecanismos asociados con la acción de las Casiopeínas es fundamental para evaluar e identificar alteraciones que pueden apuntar a mecanismos y procesos secundarios en donde estas participen, ya sea como posibles orígenes de los efectos adversos o como sitios secundarios que contribuyen a un nuevo efecto terapéutico y pueden ofrecer oportunidades sinérgicas <sup>89</sup>.

A través de un estudio de biología de sistemas se analizó la expresión génica de la línea celular HeLa tras la exposición a Cas II gly (CL<sub>50</sub> 40µM). Para esto se utilizaron dos herramientas de análisis de vías: 1) el análisis de sobre de sobrerrepresentación y 2) análisis de red causal. Se encontró que los mecanismos activados por la acción de Cas II gly están relacionados con la respuesta hacia iones metálicos, las redes de factores de transcripción y las vías del sistema inmune, así como un efecto hepatoprotector <sup>90</sup>(Figura 8).



**Figura 8. Mapa de calor de las principales vías afectadas por el tratamiento de las células HeLa con Cas II gly.** Las vías sobreexpresadas se muestran en rojo, las subexpresadas en verde. Los nombres de las vías están coloreados de acuerdo con la categoría a la que pertenecen: vías oncogénicas (rojo), sistema inmunológico (azul rey), transducción de señales (verde) redes de factores de transcripción (negro), ciclo y división celulares (azul celeste), y mantenimiento de la estructura celular (amarillo) (tomada de Espinal, 2016).

De este estudio es importante resaltar que se ha encontrado sobreexpresada la vía de traducción de señalización de la insulina, lo que sugiere que las Casiopeínas regulan la respuesta provocada por la insulina en diferentes procesos metabólicos<sup>89</sup>. Recientemente otro estudio, en donde se analizó desde el enfoque integrador de *red de rutas cruzadas* (PXN), que combina el análisis de rutas y la teoría de redes, contextualizan los procesos y funciones alteradas provocadas por el tratamiento con Casiopeínas (Cas II gly) *in vitro* y las diferentes interacciones entre ellos. En el análisis encontraron que el tratamiento de Cas II gly alteró la expresión de 78 vías, destacando los efectos sistémicos en: (a) perturbación de las vías de señalización relacionadas con la apoptosis; (b) perturbación de las vías metabólicas, y (c) activación de respuestas inmunes (Figura 9.), por lo que se han generado grandes expectativas respecto al posible efecto farmacológico que las Casiopeínas puedan tener en otras patologías<sup>91</sup>.



**Figura 9.** Red de vías alteradas por el tratamiento con Cas II-gly. Cada círculo en la gráfica es un camino. El color del borde representa el tipo de alteración: rojo para la regulación positiva, azul para la regulación negativa y púrpura para efectos mixtos. Las estructuras de la comunidad en la red están representadas por color de relleno de círculo. Cada cuadro muestra la actividad principal de esas vías: azul para las vías de señalización y procesos de apoptosis, el cuadro amarillo inferior izquierdo muestra las rutas relacionadas con la inmunidad, el cuadro rojo representa alteraciones en el metabolismo (tomada de Jáuregui,2019 ).

En cuanto a los cambios en el metabolismo de los carbohidratos, en las células tumorales expuestas a la Casiopeína II gly, se encontraron vías activadas relacionadas con el metabolismo del almidón y la sacarosa, un aumento en la glucólisis y gluconeogénesis, fructosa y manosa, galactosa, piruvato y la vía de las pentosas fosfatos reguladas al alza. Por otra parte, se describe la presunta participación en la regulación positiva en la respuesta inmune en afecciones patológicas: asma, leishmaniasis, miocarditis viral, lupus, diabetes mellitus tipo I y II<sup>91</sup>. Todos estos antecedentes sugieren nuevos objetivos de estudios para estos compuestos.

#### **2.1.4 Características farmacocinéticas de las Casiopeínas**

Los resultados de estudios de dinámica molecular y estudios farmacocinéticos en ratas Wistar han demostrado que existen diferencias importantes en cuanto a las dosis letales y los parámetros farmacocinéticos (PK) entre los diferentes isómeros existentes de las Casiopeínas. Los valores de semivida de eliminación terminal ( $t_{1/2\lambda z}$ ) y aclaramiento corporal total (CL) para Cas III Ea ( $48.146 \pm 4.653$  h y  $0.0018 \pm 0.001$  L / kg h), Cas III La ( $9.622 \pm 1.159$  h y  $0.0472 \pm 0.0122$  L / kg h), Cas III ia ( $12.46$  h y  $0.027$  L / kg h), Cas II gly ( $1.905 \pm 0.450$  h y  $3.0905 \pm 0.669$  L / kg h), respectivamente, indican que la eliminación de Cas III Ea es 26 veces más lenta en comparación con su análogo Cas III La y 15 veces más lenta en comparación con el compuesto Cas III ia. Lo anterior pone en evidencia que los isómeros Cas III La y Cas III Ea poseen un comportamiento totalmente opuesto con respecto a su farmacocinética (Tabla 4), las diferencias reportadas para estos isómeros con respecto a la biodistribución y eliminación se han atribuido a sus diferentes capacidades para cruzar las membranas celulares<sup>92</sup>.

Es sabido que, un aumento en el carácter lipofílico de los ligandos en la esfera de coordinación del átomo metálico produce una modificación en los parámetros de distribución y eliminación de los compuestos, fuertemente relacionado con su carácter hidrofóbico/hidrofílico (log P). Para las Casiopeínas, la fenantrolina modula fuertemente el paso a través de la membrana, donde, la modulación fina del proceso depende del sustituyente de la diimina y del ligando secundario. Estas pequeñas diferencias en sus estructuras son

suficientes para generar grandes diferencias respecto a su reactividad y sus efectos biológicos<sup>93</sup>.

**Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos *in vivo* de algunas Casiopeínas**

Modelo	Cas III La <sup>92</sup>	Cas III Ea <sup>92</sup>	Cas II gly <sup>94</sup>	Cas III ia <sup>112</sup>
	(1 mg/kg) dosis única	(4 mg/kg) dosis única	(8 mg/kg) dosis única	(9 mg/kg) dosis única
Vc [ mL/kg]	90.372 ± 20.41	76.169 ± 4.40	-	-
K <sub>10</sub> [ h <sup>-1</sup> ]	0.446 ± 0.04	0.025 ± 0.002	-	-
K <sub>12</sub> [h <sup>-1</sup> ]	5.856 ± 0.99	0.960 ± 0.21	-	-
K <sub>21</sub> [h <sup>-1</sup> ]	1.139 ± 0.17	1.526 ± 0.34	-	-
t <sub>1/2K10</sub> [h <sup>-1</sup> ]	1.562 ± 1.13	27.499 ± 2.24	3.8	12.46
λ <sub>z</sub> [h <sup>-1</sup> ]	0.073 ± 0.008	0.015 ± 0.001	-	-
T <sub>1/2λz</sub> [ h]	9.622 ± 1.16	48.146 ± 4.65	-	-
AUC [ μg h/ml]	3.180 ± 1.11	307.089 ± 21.66	-	-
CL [ L / kg h]	0.0472 ± 0.012	0.0018 ± 0.0001	0.066	0.027
MRT [h]	12.388 ± 1.12	67.830 ± 6.24	4.38	17.14
V <sub>ss</sub> [mL/kg]	471.52 ± 122.07	124.704 ± 11.16	-	462.0

Todos los compuestos se evaluaron en ratas Wistar machos por administración vía intravenosa. **Vc**= volumen compartimental; **K<sub>10</sub>**=tasa de eliminación; **K<sub>12</sub>**= velocidad de transferencia del plasma al tejido; **K<sub>21</sub>**: tasa de transferencia del tejido al plasma; **t<sub>1/2K10</sub>**=vida media terminal; **λ<sub>z</sub>**=fase terminal; **t<sub>1/2λz</sub>**= fase terminal de semivida; **UAC**= área bajo la curva; **CL**= aclaramiento; **MRT**= tiempo medio de residencia; **V<sub>ss</sub>** = volumen en estado estacionario.

Otra propiedad fisicoquímica de las Casiopeínas fuertemente modulada por las fenantrolinas es su potencial redox. El potencial de media onda (E<sub>1/2</sub>), describe el comportamiento redox del centro metálico (Tabla 5) y se propone que las diferencias en este parámetro ayudan a describir las actividades biológicas observadas (DL<sub>50</sub> o IC<sub>50</sub>). Al igual que con las propiedades hidrofóbicas/hidrofílicas, para el potencial redox la modulación principal la impone por la diimina presente en la esfera de coordinación, mientras que los sustituyentes de la diimina producen una modulación fina en la distribución de la densidad electrónica, es decir, la influencia del entorno electrónico alrededor del centro metálico.

**Tabla 5. Características fisicoquímicas de las Casiopeínas<sup>93</sup>.**

Compuesto	PM (g/mol)	E <sub>1/2</sub> (v)	Log D	Pka
Cas I gly	550.02	0.426	-	4.84
Cas III Ha	550.07	0.418	1.06±0.08	4.84
Cas II gly	425.88	0.330	-	5.95
Cas III Ea	448.91	0.322	-0.81±0.06	5.94
Cas VI gly	425.88	0.348	-	5.60
Cas III La	467.93	0.342	-0.81±0.02	5.60
Cas IV gly	419.87	0.324	-	5.34
Cas III ia	426.91	0.302	-0.95±-0.95	5.34
Cas VIII gly	453.93		-	6.48
Cas III Ma	461.97		-0.49±0.01	6.48

*García et.al.*, (2017), determinaron los efectos de estos compuestos en dos tipos de células sanas, linfocitos (HPBL) y macrófagos (HPBM) de sangre periférica humana, para elucidar si las diferencias observadas en la toxicidad (DL<sub>50</sub>) y los parámetros farmacocinéticos, podrían estar asociadas a las interacciones de estos compuestos con la membrana celular y su facilidad para atravesarla. La primera evaluación de la viabilidad en linfocitos expuestos permitió probar la capacidad del compuesto para pasar a través de una membrana celular y generar un efecto citotóxico, mientras que la evaluación de la viabilidad de macrófagos expuestos, permitió observar el efecto de las Casiopeínas al ser fagocitada por los macrófagos<sup>93</sup>. Las diferencias que se observaron en este experimento entre Cas III Ea y Cas III La, se podrían explicar considerando las interacciones de estos compuestos con las membranas celulares. De los resultados de dinámica molecular, el compuesto Cas III La requiere un menor gasto de energía para cruzar la membrana celular, lo que podría manifestarse como una vida media más baja y una mayor citotoxicidad hacia los linfocitos de sangre periférica humana en comparación con su isómero la Cas III Ea. Los estudios en linfocitos y macrófagos muestran que la citotoxicidad es selectiva principalmente hacia células tumorales, cuyos valores de IC<sub>50</sub> se encuentran en el intervalo de 136 – 14,600 μM (Tabla 6).

**Tabla 6. Efectos citotóxicos en linfocitos (HPBL) y macrófagos (HPBM) de sangre periférica.**

Compuesto	HPBL <sup>93</sup>	HPBM <sup>93</sup>	Log P <sup>93</sup>
	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>50</sub> (μM)	
Cas I gly	134.0	358.0	4.48
Cas III Ha	64.0	136.0	5.85
Cas II gly	1720.0	1140.0	1.67
Cas III Ea	3860.0	1830.0	3.04
Cas VI gly	216.0	3800.0	2.54
Cas III La	35.0	1600.0	3.04
Cas IV gly	3260.0	14,600.0	1.67
Cas III ia	4700.0	2470.0	1.17
Cas VIII gly	-	-	2.59
Cas III Ma	-	-	3.96

Los resultados de la Tabla 6 muestran que, aunque la citotoxicidad en linfocitos y macrófagos no está limitada por el carácter hidrofóbico de las moléculas y su paso a través de la membrana celular, si contribuye en el tiempo de eliminación. De manera general, a medida que aumenta el carácter hidrofílico del compuesto, los parámetros de PK como la vida media ( $t_{1/2}$ ) o el aclaramiento (CL) adquieren valores más altos (Tabla 4). Además, en la tabla 6 se observa que, al aumentar el carácter hidrofóbico, existe una mayor citotoxicidad sobre linfocitos y macrófagos. Sin embargo, cada compuesto podría interactuar de manera diferente con las proteínas plasmáticas o las membranas celulares, lo que puede modificar su biodistribución y reactividad.

### 2.1.5 Toxicidad de las Casiopeínas

Hasta el momento se ha descrito la importancia biología de estos compuestos como potenciales nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes patologías. A pesar de ello, existen pocos ensayos donde evalúen su toxicidad más allá de su potencial citotóxico en líneas celulares cancerígenas. Bravo y colaboradores (2009), evaluaron la toxicidad de seis

Casiopeínas en modelos murinos. Encontraron que los complejos con fenantrolinas son aproximadamente 2.5 veces más tóxicos que sus análogos de biperidinas. El compuesto Cas III Ea comparado con su análogo Cas III ia presenta una disminución significativa en cuanto a la toxicidad, esto se atribuye a la ausencia del anillo aromático central, siendo la única diferencia estructural entre ellos<sup>82</sup> (Tabla 7).

**Tabla 7. Toxicidad (LD<sub>50</sub>) en ratones y ratas Wistar, machos.**

Compuesto	LD <sub>50</sub> <sup>82,112</sup> (μmol/kg)	
	Ratones ICR Machos	Ratas Wistar Machos
Cas I gly	-	-
Cas III Ha	24.96 ± 1.79 ip.	-
Cas II gly	36.61 ± 5.07 ip.	19.86 ± 3.49 ip.
Cas III Ea	22.92 ± 1.82ip.	14.0 iv.
Cas VI gly	-	-
Cas III La	26.38 ± 1.39 iv.	7.2 iv.
Cas IV gly	-	-
Cas III ia	51.43 ± 2.39ip	33.64 ± 1.36 ip.
Cas VIII gly	-	-
Cas III Ma	16.23 ± 2.63ip	-

### 3.0 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se dispone de una variedad de alternativas terapéuticas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, los mecanismos de acción de estos fármacos son variados, siendo el objetivo de todos los tratamientos el mantener las cifras de glucemia lo más cercanas a los valores fisiológicos de un individuo sano (80 – 120 mg/dL). Pero, a pesar de que existe esta gran variedad de fármacos para controlar la hiperglucemia, no son totalmente efectivos para lograr un buen control glucémico y prevenir el progreso de la enfermedad, bien sea por un tratamiento y control inadecuado, o por los efectos adversos del tratamiento. Por lo que, existe la necesidad de buscar nuevas y mejores terapias farmacológicas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, con mejor eficacia y menor frecuencia de efectos adversos que los fármacos actuales.

Aunque las Casiopeínas fueron diseñadas como una terapia antitumoral alternativa, también se les ha reportado actividades biológicas como antiparasitarios y espermatocidas, lo que sugiere que tienen un gran potencial bioactivo. Para contrarrestar la toxicidad asociada a las Casiopeínas, se planteó la adición de un metal esencial como el cobre. Esto con la finalidad de disminuir importantemente la toxicidad, debido a que los metales esenciales se metabolizan más fácilmente que otros iones, lo que reduciría en gran medida los efectos adversos. Por otro lado, existen antecedentes generados en otras investigaciones sugieren que las Casiopeínas pueden tener efecto sobre la regulación en la vía de la glucólisis, así como la actividad a la alza de la vía de señalización de la insulina lo que nos permite sugerir que estos compuestos pueden contribuir en la regulación de la glucosa circulante. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó determinar su potencial terapéutico contra la diabetes mellitus.

## **4.0 HIPÓTESIS**

Las Casiopeínas presentarán efecto anti-hiperglucemiante e hipoglucemiante en modelos murinos sanos y diabéticos.

## **5.0 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto anti-hiperglucemiante e hipoglucemiante de las Casiopeínas en modelos murinos sanos y diabéticos.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Evaluar la actividad anti-hiperglucemiante *in vivo* de las Casiopeínas en un modelo de hiperglucemia inducida con almidón de maíz.
- ✓ Evaluar la capacidad de las Casiopeínas de inhibir la absorción intestinal de glucosa mediante un modelo *in vitro* de saco intestinal invertido de rata.
- ✓ Evaluar el efecto hipoglucémico y antidiabético sistémico de las Casiopeínas en ratones normoglucémicos y diabéticos inducidos con aloxano.

## **6.0 METODOLOGÍA**

### **6.1 Animales**

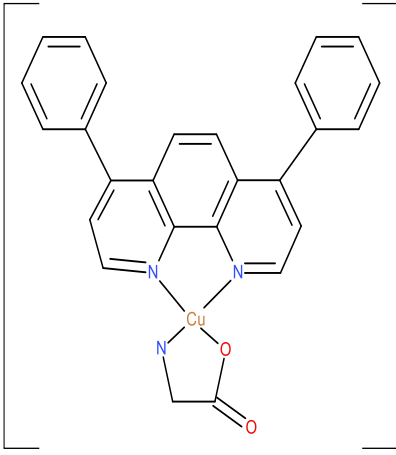
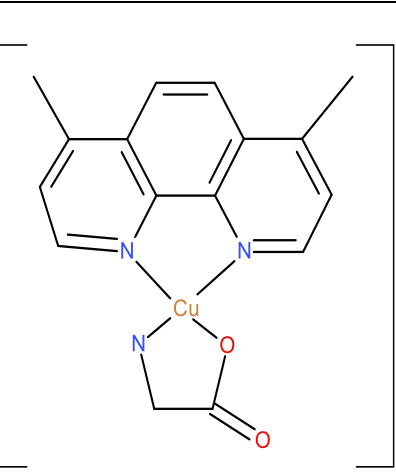
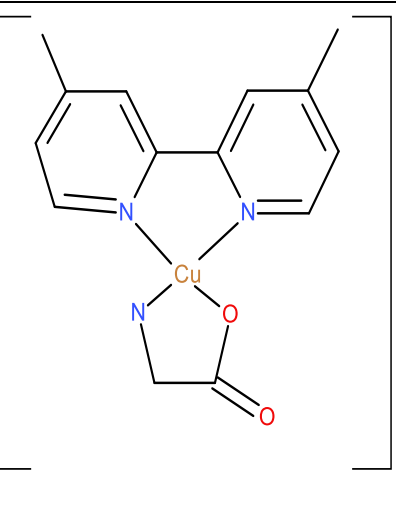
Para la evaluación de la actividad antihiper glucémica se emplearon ratas Wistar, machos adultos jóvenes, de 2 a 3 meses de edad con un peso promedio de 350 a 450 gramos. Para la evaluación de la actividad hipoglucemiante, se emplearon ratones CD1, machos adultos jóvenes, de 2 a 3 meses de edad con un peso promedio de 30 a 38 g, obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas a temperatura constante (23-25°C), humedad controlada (50%), con acceso libre al agua y alimento *ad libitum* durante los experimentos.

Todos los ensayos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las pautas de cuidado y uso de animales de la Directiva 86/609 / CEE del Consejo de las Comunidades Europeas. Los animales fueron alojados de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM 062-ZOO-1999). El protocolo experimental fue registrado en el Comité de Investigación y sometido para su aval ante la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL) de la Facultad de Medicina (UAEM).

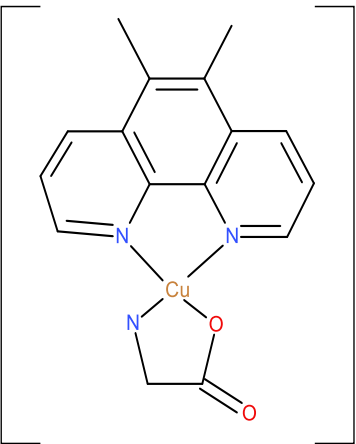
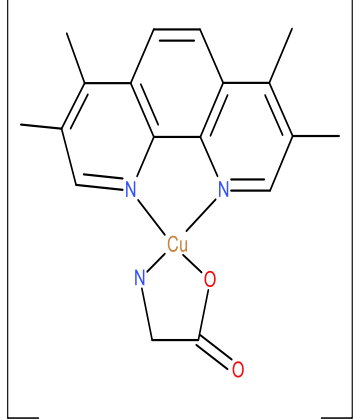
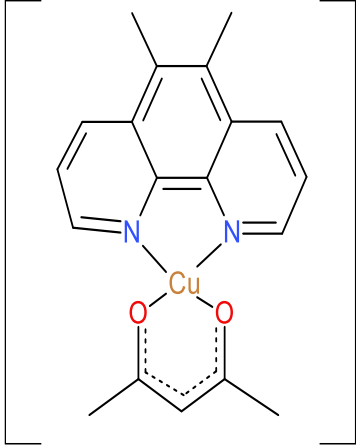
### **6.2 Compuestos**

Se evaluaron diez compuestos de coordinación del grupo de las Casiopeínas, que fueron sintetizados en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la Dra. Lena Ruiz Azuara. En la Tabla 8 se muestran los nombres químicos de acuerdo con la IUPAQ, su estructura química y la clave con la que serán identificados.

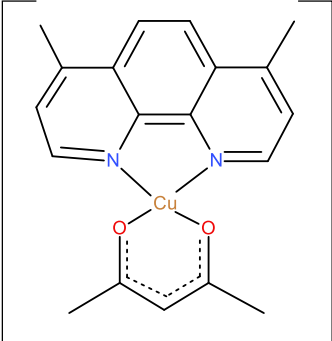
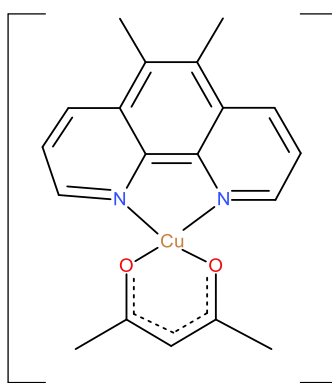
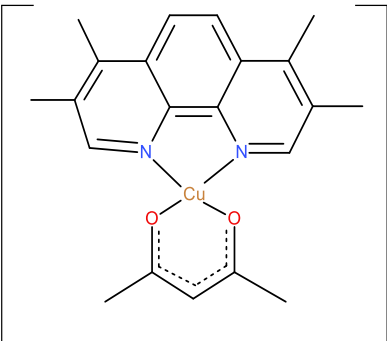
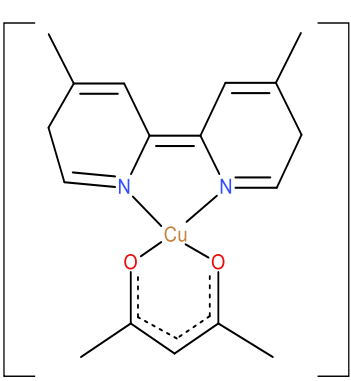
**Tabla 8. Nombre químico, estructura y clave de los compuestos de coordinación evaluados.**

Nombre químico	Estructura	clave
<p>[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (glicinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas I gly</p>
<p>[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas II gly</p>
<p>[Cu(4,4′ dimetil-2,2′-bipiridina) (glicinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas IV gly</p>

Continúa tabla 8...

<p>[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina) (glicinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas VI gly</p>
<p>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina) (glicinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas VIII gly</p>
<p>[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) (acetilacetionato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas III Ha</p>

continua tabla 8...

<p>[Cu(4,7-dimetil-1,10fenantrolina) (acetilacetato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas III Ea</p>
<p>[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas III La</p>
<p>[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina) (acetilacetato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas III Ma</p>
<p>Cu(4,4-dimetil-2,2-bipiridina) (glicinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub></p>		<p>Cas III ia</p>

### **6.3 Actividad anti-hiperglucemiante**

Para evaluar del efecto anti-hiperglucemiante de las Casiopeínas se utilizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Se utilizaron grupos de ratas con una n=6 con ayuno previo de 8 horas. Como control negativo se usó almidón (1 g/kg de peso) para inducir la hiperglucemia y control positivo almidón + acarbosa (0.5 mg/kg de peso). Las diferentes Casiopeínas fueron administradas por vía oral con una cánula de acero inoxidable, a una concentración de 0.5 mg/kg. Para realizar la prueba inicialmente se midió los valores de glucosa basal tomando una gota de sangre de la cola de las ratas, antes de la administración y posterior a esta en intervalo de 15, 30, 45, 60 y 120 minutos, utilizando un glucómetro digital (Accu-check, Roche Diagnostics, SL).

### **6.4 Efecto de las Casiopeínas en la absorción intestinal de glucosa en el modelo de saco invertido**

La absorción de glucosa se evaluó utilizando el modelo de intestino invertido de rata como lo describe Hamilton (2013)<sup>36</sup>. Para obtener el tejido intestinal las ratas se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente se removió el intestino completo. Después, el intestino se lavó con solución salina fría y se cortó en fragmentos de 7 cm, calculando la proporción con la longitud del segmento proximal. Posteriormente, para generar los sacos, se introdujo un capilar dentro de los segmentos de intestino y se fijó al extremo con una doble ligadura. Seguidamente se realiza la eversión desplazando el tejido hacia el extremo ligado.

Para el ensayo los sacos de intestino se montaron en tubos cónicos, que contiene 25 mL de una solución de Dextrosa (100 mg/dL) y por el tubo lateral del frasco se burbujea una mezcla de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de manera continua para asegurar la presencia de oxígeno. El saco se sujetó a una pipeta Pasteur, de la que se toman las muestras, y se llenó con aproximadamente 0.3 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0.9%), en incubación a 37 °C. Para medir el efecto de las Casiopeínas en la cinética de absorción de glucosa intestinal, a la solución de dextrosa se le agregaron las Casiopeínas en concentraciones crecientes, el inhibidor de SGLT2 empagliflozina como control positivo y el vehículo como control negativo. Posteriormente, se tomaron alícuotas de aproximadamente 10 µL cada 30 minutos durante 3 horas, de la solución que se encuentra en el interior del saco intestinal para medir la glucosa utilizando,

utilizando un glucómetro digital (Accu-chek, Roche Diagnostics, SL). Para cada tratamiento evaluado se utilizó una n=6 sacos por grupo.

### **6.5 Actividad hipoglucemiante**

Para determinar el efecto hipoglucemiante de las Casiopeínas se utilizaron ratones normoglucemicos. Para la evaluación del efecto, se utilizaron grupos de ratones con una n=6 sin ayuno previo. Como controles positivos se usaron insulina (5 UI/kg de peso) y como secretagogo de insulina, glibenclamida (0.5 mg/kg de peso). Las diferentes Casiopeínas fueron administradas vía intraperitoneal, a concentraciones de 1, 5, y 10 mg/kg de peso. En todos los experimentos, inicialmente se midió los valores de glucosa basal tomando una gota de sangre de la cola de las ratas, y posterior a esta en intervalos de 1 hora durante 6 horas, utilizando un glucómetro digital (Accu-chek, Roche Diagnostics, SL).

Para el modelo diabético, los ratones con un peso inicial de 18 a 22 g se indujeron vía intraperitoneal con 220 mg/kg de aloxano disuelto en agua. Para realizar la inducción, inicialmente, se midió los valores de glucosa basal tomando una gota de sangre de la cola de las ratas, antes de la administración y dos semanas después, utilizando un glucómetro digital (Accu-chek, Roche Diagnostics, SL). Se consideraron como ratones diabéticos aquellos con niveles de glucosas superiores a 350 mg/dL.

Para evaluar el efecto preliminar anti- diabético de las Casiopeínas, se utilizaron grupos de ratones con una n=3 sin ayuno previo. Como control positivo se usó insulina (5 y 10 mg/kg de peso) y como control negativo el vehículo utilizado en cada tratamiento. Las diferentes Casiopeínas fueron administradas por vía intraperitoneal, a concentraciones de 5 y 10 mg/kg. Para realizar la prueba inicialmente se midió los valores de glucosa basal tomando una gota de sangre de la cola de las ratas, antes de la administración y posterior a esta en intervalos de 1 hora durante 6 horas, utilizando un glucómetro digital (Accu-chek, Roche Diagnostics, SL).

### **6.6 Análisis estadísticos**

Los resultados se expresaron como la media de 6 animales  $\pm$  error estándar de la media. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnet para

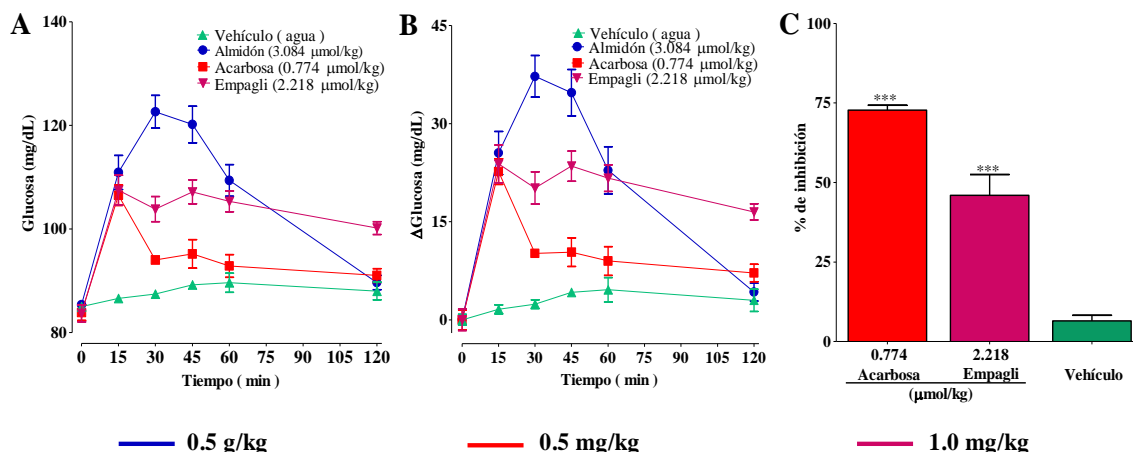
evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos correspondientes. Se consideró que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $P < 0.05$ . A partir de los cursos temporales se realizó el cálculo del área bajo la curva (ABC) con el método de trapezoides. Todos los análisis estadísticos se realizaron con GraphPad Prism v.8.0.

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Actividad anti-hiperglucemiante *in vivo* de las Casiopeínas en un modelo de hiperglucemia inducida por almidón.

Para determinar si las diferentes Casiopeínas poseen efecto anti-hiperglucemiante mediante la inhibición de las enzimas involucradas en la digestión de los carbohidratos, primero se validó el modelo de hiperglucemia inducido por la administración vía oral (V.O.) con una carga de almidón de maíz (1.0 g/kg) en ratas Wistar, machos. La Figura 10 A y B, muestra el curso temporal de hiperglucemia inducida por almidón de maíz, y el efecto en la hiperglucemia de los controles positivos; Acarbosa (0.5 mg/kg) y Empagliflozina (1.0 mg/kg), y el efecto del vehículo (agua) como control negativo, durante el periodo de evaluación.

Se puede observar que la administración de almidón incrementa los niveles de glucosa plasmática, en los primeros 15 minutos ocurre una digestión parcial y la digestión total en glucosa a los 30 minutos (pico máximo:  $37.27 \pm 3.18$  mg/dL). Mientras tanto, la administración de acarbosa y empagliflozina inhiben la hidrólisis y absorción de los hidratos de carbono, respectivamente, disminuyendo el pico glucémico postprandial (a los 30 minutos) inducido por la administración de almidón con valores de glucosa de  $10.17 \pm 0.58$  y  $20.2 \pm 2.4$  mg/dL, cuando se administra acarbosa y empagliflozina, respectivamente. Por otro lado, la evaluación del vehículo (agua destilada), mostró que la administración y manipulación de los animales de experimentación no producen cambios significativos en los niveles de glucosa en sangre durante el periodo de evaluación. En la Figura 10C los cambios se expresan como porcentaje de cambio calculada a partir de los cursos temporales. Se observó que la acarbosa y la empagliflozina inhibieron el pico hiperglucémico en un  $72.72 \pm 1.55$ ,  $45.98 \pm 6.55$  %, respectivamente.



**Figura 10. Estandarización del modelo de hiperglucemia inducida por almidón de maíz en ratas Wistar, macho.** En A y B se muestran los cursos temporales de la hiperglucemia inducida con almidón de maíz [3.084 μmol/kg] (control positivo), Almidón + Acarbosa [0.774 μmol /kg] (control negativo), Almidón + Empagliflozina (2.218 μmol/kg) y vehículo (agua), expresados como porcentaje de cambio de la glucosa. En C los datos se expresan como el porcentaje de inhibición del pico hiperglucémico máximo a los 30 minutos. Cada punto representa el promedio ± SEM de una n=6 animales. \*\*\* P<0.001 con respecto al vehículo de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en (mg/kg) al que corresponde cada tratamiento.

Después de validar el modelo de hiperglucemia inducida por almidón de maíz, se realizó una evaluación preliminar para determinar si las diez Casiopeínas mostraban efecto anti hiperglucemiante, a la dosis de 0.5 mg/kg y administradas vía oral (p.o.). Se realizó un curso temporal, para calcular el porcentaje de inhibición de la hiperglucemia respecto al pico máximo y el análisis del ABC. Los resultados mostrados en la Tabla 9, muestran que todas las Casiopeínas muestran un efecto antihyperglucemiante moderado en comparación con el grupo tratado con almidón + veh. Entre estas, las Casiopeínas Cas III La, Cas II gly, Cas I gly, Cas III Ma y Cas III Ha, disminuyen la hiperglucemia entre un  $44.55 \pm 14.46$  y un  $55.49 \pm 10.45\%$ .

**Tabla 9. Porcentajes de efecto en la actividad anti-hiperglucemiante a los 30 minutos de la administración de almidón**

Tratamiento	Dosis [ $\mu\text{mol/kg}$ ]	% de disminución al pico máximo	% de disminución del ABC
Acarbosa	0.774	$72.72 \pm 1.55$	$51.86 \pm 4.50$
Empagliflozina	2.217	$45.98 \pm 6.55$ ns	$6.68 \pm 5.08$
Cas III La	1.069	$55.49 \pm 10.45$ ns	$28.93 \pm 16.98^*$
Cas II gly	1.174	$49.56 \pm 8.92$ ns	$40.55 \pm 15.37$ ns
Cas I gly	0.909	$45.89 \pm 9.18$ ns	$21.07 \pm 15.18^{**}$
Cas III Ma	1.082	$44.55 \pm 14.46$ ns	$27.32 \pm 20.70^*$
Cas VIII gly	1.101	$37.84 \pm 7.25^*$	$17.71 \pm 12.17^{**}$
Cas III Ha	0.909	$36.70 \pm 10.41^*$	$22.40 \pm 10.53^*$
Cas III Ea	1.114	$37.90 \pm 4.63^*$	$11.37 \pm 12.08^{***}$
Cas III ia	1.171	$34.98 \pm 8.80^{**}$	$-9.62 \pm 19.31^{***}$
Cas VI gly	1.174	$21.46 \pm 6.08^{***}$	$11.15 \pm 17.27^{***}$
Cas IV gly	1.191	$19.20 \pm 5.73^{***}$	$7.16 \pm 19.91^{***}$

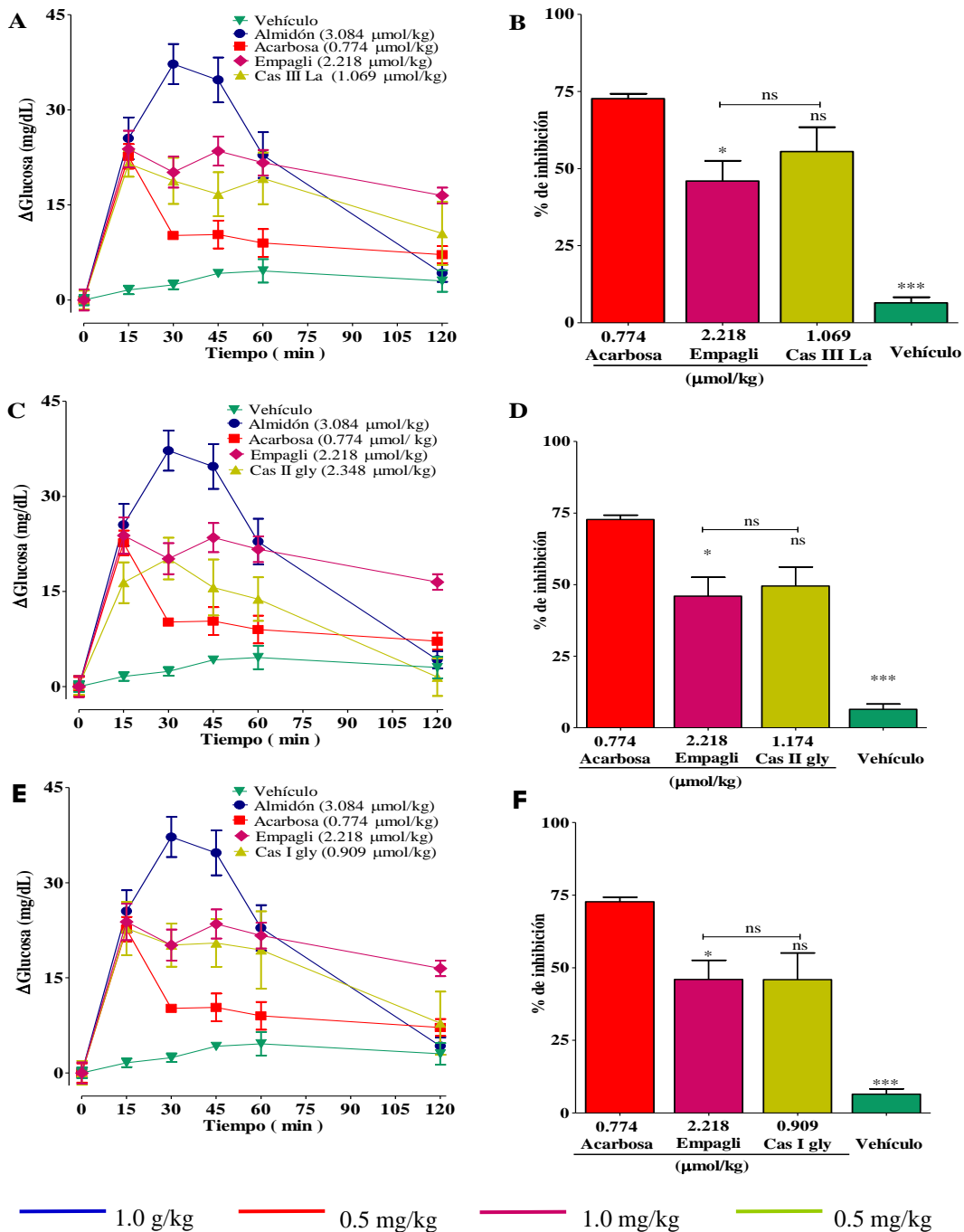
Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una n=8 animales. \* P <0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, ns: sin diferencia estadísticas con respecto al control de acarbosa para cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Para las Casiopeinas las dosis en  $\mu\text{mol/kg}$  corresponden a 0.5 mg/kg, para acarbosa 0.5 mg/kg y empagliflozina 1.0 mg/kg.

En las Figuras 11A-F, se muestran los cursos temporales en porcentaje de cambio de la concentración de glucosa ( $\Delta\text{glucosa mg/dL}$ ), de las tres Casiopeínas que presentaron mejor actividad anti-hiperglucemiante. El compuesto Cas III La (Figura 11A-B), mostró un comportamiento similar al de acarbosa, lo que sugiere que Cas III La podría inhibir las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas para producir una inhibición del  $55.49 \pm 10.45$  % al al minuto 30. La inhibición observada al minuto 15 se mantiene hasta el minuto 60. Al final del experimento, los niveles de glucemia no regresan a su nivel basal comparado con el control negativo, indicando una reducción de la glucemia de  $28.93 \pm 16.98$  %.

En cambio, el compuesto Cas II gly (Figura 11C-D) inicia la inhibición de la hidrólisis de los carbohidratos a los 15 minutos después de la administración, aunque a una velocidad menor que los controles positivos y que la Cas III ia, como lo muestra la pendiente de la curva que

describe su comportamiento con respecto al tiempo (Figura 11C). Aunque la velocidad inicial parece menor, la inhibición al minuto 30 es de  $49.56 \pm 8.92 \%$ . Después de la absorción se inicia su utilización y finalmente se obtiene una disminución del pico hiperglucémico de  $40.55 \pm 15.37 \%$ . En la Figura 11E-F, se observa el curso temporal del cambio de glucosa inducido al administrar el compuesto Cas I gly, se observa una inhibición en el pico máximo de hiperglucemia de  $55.49 \pm 10.45 \%$ . Este efecto se mantiene desde minuto 15 hasta el minuto 60, después de los 60 minutos los niveles de glucosa disminuyen, pero no regresan a su nivel basal, e incluso se observa una absorción más rápida que la obtenida con almidón. Finalmente se obtuvo una reducción de la glucemia de  $21.07 \pm 15.18 \%$ .

Es importante señalar que, aunque la comparación de inhibición de hiperglucemia se realiza al tiempo en el que se presenta el mayor registro de glucosa circulante provocada por la administración de almidón de maíz vía oral, todos los compuestos de coordinación evaluados comienzan a presentar el efecto anti- hiperglucémico a los 15 minutos, de la misma forma que acarbosa y empagliflozina. Solo el compuesto Cas II gly presenta una velocidad menor para alcanzar su máximo efecto antihiperglucemiante (Figura 11 C). De manera general, los efectos inhibitorios de los compuestos de coordinación se encuentran por debajo del efecto presentado por la acarbosa ( $0.774 \mu\text{mol/kg}$ ) evaluado a los 30 minutos (pico máximo hiperglucémico por administración de almidón), aunque estadísticamente no hay diferencias significativas entre los efectos que producen estos compuestos. Por otra parte, las cinéticas que presentaron son comparables con las presentadas por la empagliflozina ( $0.5 \text{ mg/kg}$ ). Los valores de inhibición y dosis de compuestos administrado nos permiten establecer que los compuestos de coordinación ( $0.5 \text{ mg /kg}$ ) son hasta 7 veces más potentes que la empagliflozina ( $1 \text{ mg/kg}$ ) para producir la misma respuesta inhibitoria correspondiente al ABC (Tabla 9).

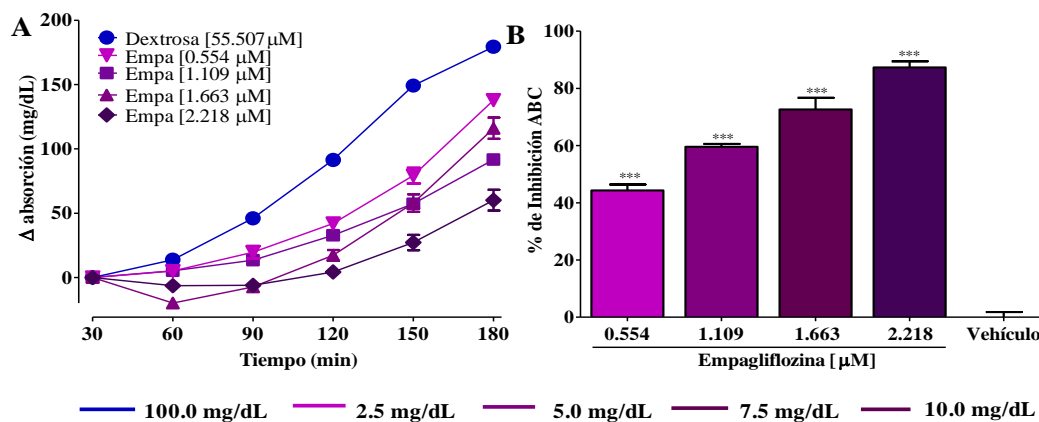


**Figura 11. Evaluación del efecto antihyperglucémico de las Casiopeínas Cas III La, Cas II gly y Cas I gly.** En los paneles A, C, E, se muestran los curso temporales del efecto de las Casiopeínas en la hiperglucemia inducida con almidón. A. Cas III La [1.069 μmol/ kg], B. Cas II gly [1.174 μmol/ kg] y C. Cas I gly [0.909 μmol/ kg]. B, D, F. Porcentaje de inhibición del pico hiperglucémico máximo a los 30 minutos. Cada punto representa el promedio ± SEM de una n=6 animales. \* P <0.05, \*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001, ns: no significativo, con respecto al control de acarbosa de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en (mg/kg) al que corresponde cada tratamiento.

## 7.2 Evaluación de la absorción intestinal de glucosa *in vitro* de las Casiopeínas en el modelo de saco intestinal invertido de rata

Para determinar si el mecanismo anti-hiperglucemiante de las Casiopeínas involucra la inhibición de la absorción intestinal de glucosa, se utilizó el modelo de absorción intestinal *in vitro* en sacos intestinales invertidos de rata. Primero, se determinó la cinética de absorción de glucosa a intervalos de 30 minutos durante tres horas y posteriormente se evaluó el efecto de empagliflozina, un inhibidor de SGLT2 en dicha cinética. La Figura 12A, muestra los resultados expresados en deltas totales ( $\Delta$ glucosa mg/dL) del curso temporal de la evaluación de absorción de dextrosa presente a una concentración de 100 mg/dL (5550.7  $\mu$ M) en ausencia y en presencia de dosis crecientes de empagliflozina (control positivo).

La cinética muestra que la glucosa se absorbe gradualmente durante el tiempo de evaluación alcanzando una absorción máxima de  $180.5 \pm 2.7$  mg/dL de glucosa, a las tres horas de evaluación. Por otro lado, se observó que empagliflozina inhibe la absorción de glucosa, de manera dependiente de la concentración (Figura 12B), y que su eficacia máxima de inhibición de la absorción se alcanza con la concentración de 10.0 mg/dL (221.77  $\mu$ M).



**Figura 12. Efecto de la empagliflozina, un inhibidor selectivo del Cotransportador de glucosa, en la absorción intestinal de glucosa *in vitro*.** A. Curso temporal de la absorción de (55.507  $\mu$ M) y Dextrosa + empagliflozina (0.554-2.218 $\mu$ M, control positivo). B. Porcentajes de inhibición para empagliflozina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una n=8 sacos. \*\*\* P<0.001 con respecto al vehículo de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en (mg/dL) al que corresponde cada tratamiento.

Después de estandarizar el modelo, se realizó un ensayo bajo las mismas condiciones, pero ahora con las 10 Casiopeínas, para determinar si tienen efecto sobre la absorción de glucosa a nivel intestinal. En la Tabla 10, los resultados de inhibición, de absorción de glucosa, muestran que no existen diferencias significativas entre el efecto que producido por los compuestos y el que posee la empagliflozina (221.77  $\mu\text{M}$ ) utilizada como control positivo y los compuestos.

**Tabla 10. Porcentajes de inhibición de la absorción intestinal de las Casiopeínas**

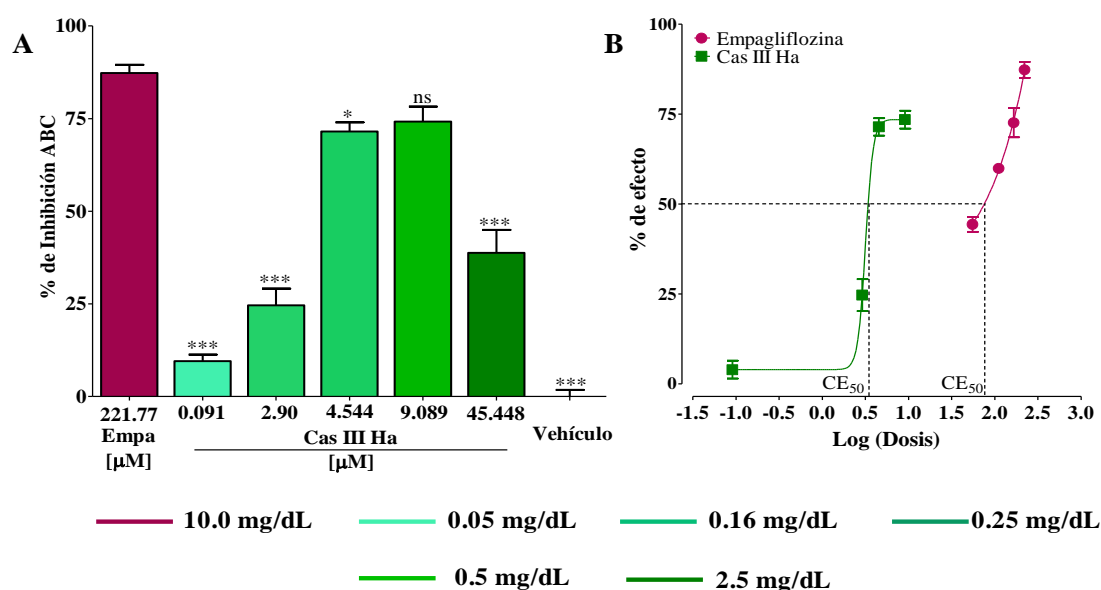
Tratamiento	Concentración [ $\mu\text{M}$ ]	% de inhibición al pico máximo Al min 180	% de inhibición del ABC
Empagliflozina	221.77	66.52 $\pm$ 1.30	87.30 $\pm$ 2.22
Cas III Ha	9.089	64.17 $\pm$ 5.50 <sup>ns</sup>	73.08 $\pm$ 4.58 <sup>ns</sup>
Cas III ia	11.712	72.02 $\pm$ 2.88 <sup>ns</sup>	72.72 $\pm$ 2.38 <sup>ns</sup>
Cas VI gly	11.740	71.74 $\pm$ 0.92 <sup>ns</sup>	72.70 $\pm$ 1.37 <sup>ns</sup>
Cas VIII gly	11.014	52.45 $\pm$ 4.65 <sup>ns</sup>	68.54 $\pm$ 3.67 <sup>ns</sup>
Cas I gly	9.090	65.56 $\pm$ 3.29*	67.05 $\pm$ 1.69*
Cas III Ma	10.823	45.76 $\pm$ 7.47***	53.90 $\pm$ 6.66***
Cas II gly	11.740	49.94 $\pm$ 0.57***	48.71 $\pm$ 1.05***
Cas III Ea	11.138	46.60 $\pm$ 16.35***	44.76 $\pm$ 11.25***
Cas IV gly	11.908	30.15 $\pm$ 5.38***	29.37 $\pm$ 7.38***
Cas III La	10.685	12.58 $\pm$ 6.61***	4.65 $\pm$ 13.97***

Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una n=6 sacos. \* P <0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 ns: no significativo con respecto al control de empagliflozina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Para las Casiopeínas las dosis en  $\mu\text{mol/dL}$  corresponden a 0.5 mg/dL y para empagliflozina 10.0 mg/dL.

Es importante señalar que la concentración con la que empagliflozina presentó su efecto máximo, expresada en  $\mu\text{M}$ , es de 18.9 a 24.3 veces mayor que las utilizadas para que las diferentes Casiopeínas presenten un efecto inhibitorio de absorción de glucosa comparable con empagliflozina. Para aquellos compuestos que presentaron el mismo efecto inhibitorio

que empagliflozina, se evaluaron diferentes concentraciones para determinar si el efecto es dependiente de la dosis y calcular la Dosis Efectiva media (DE<sub>50</sub>) para cada compuesto.

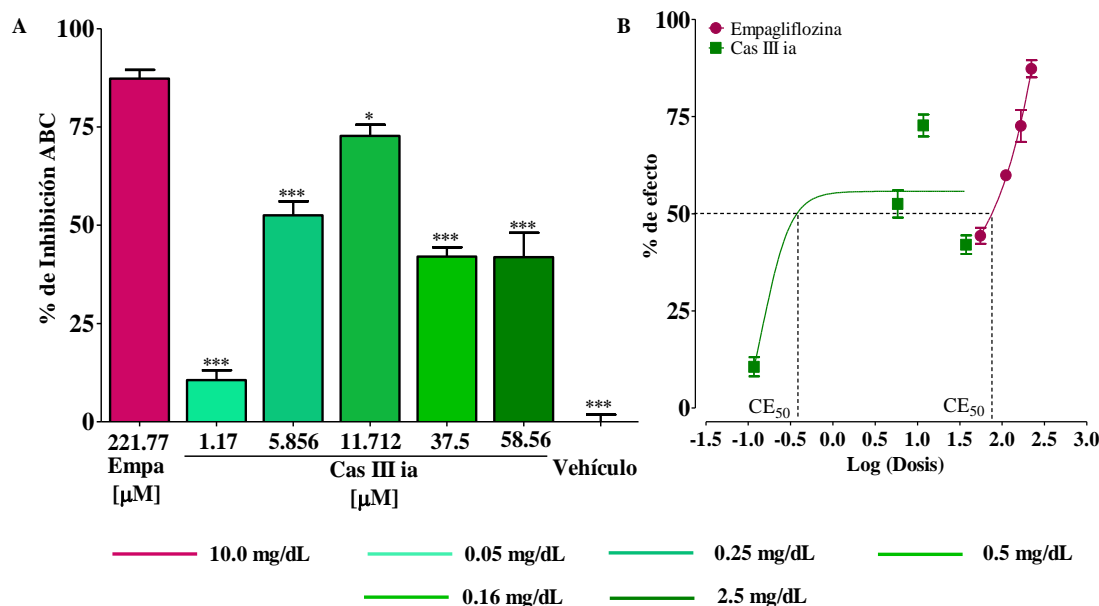
Los resultados expresados como porcentaje de inhibición del ABC (Figura 13A.), muestran que Cas III Ha inhibe la absorción de glucosa de forma dependiente de la concentración. Su efecto inhibitor es estadísticamente significativo a partir de 2.90 μM, alcanzando su eficacia máxima de inhibición (73.03 ± 4.58%) a la concentración de 9.089 μM, concentración a la que no existe diferencia significativa (ns) con el efecto producido por empagliflozina (221.77 μM). El efecto de Cas III Ha se alcanza con una concentración casi 25 veces menor que la empagliflozina, lo que nos permite establecer que los compuestos de coordinación son más potentes para inhibir la absorción de glucosa que empagliflozina, sin embargo, se comporta como un antagonista parcial (Figura 13B.)



**Figura 13. Inhibición *in vitro* de la absorción de glucosa por efecto de Cas III Ha.** En A se muestra el efecto de Cas III Ha expresado como porcentajes de inhibición. B. Curvas dosis-respuesta de Cas III Ha y Empagliflozina. Cada punto representa el promedio ± SEM de una n=6 sacos. \* P <0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 ns: no significativo con respecto al control de empagliflozina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis (en mg/dL) al que corresponde cada tratamiento.

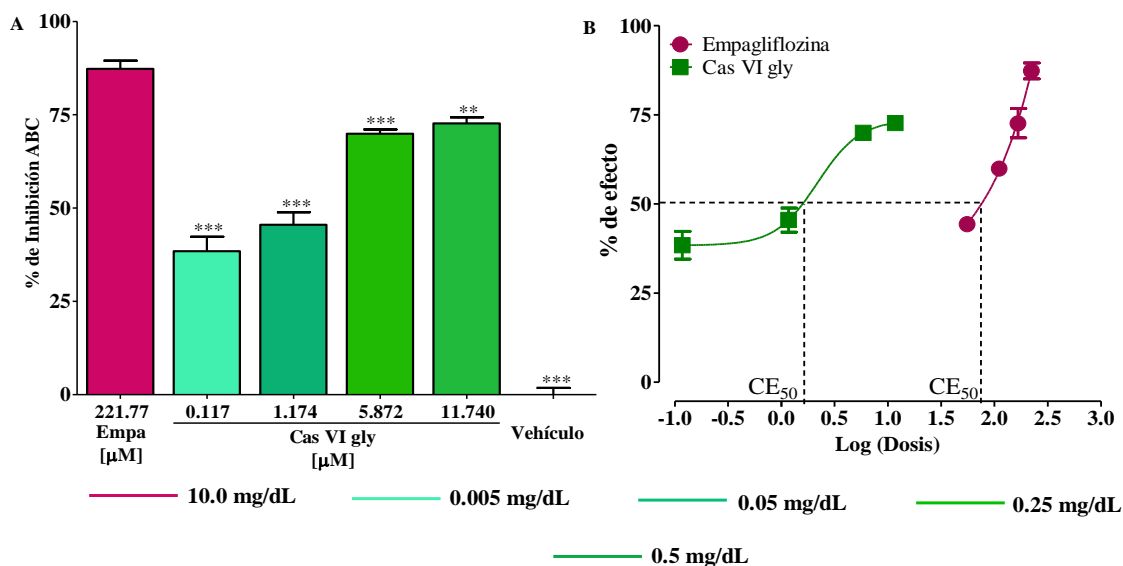
Por otro lado, Cas III ia también inhibió la absorción de glucosa en el rango de concentraciones evaluadas, siendo estadísticamente significativo el efecto a partir de la concentración 5.856 y

hasta la concentración de 58.86  $\mu\text{M}$ . La eficacia máxima de inhibición que presentó este compuesto fue de  $72.72 \pm 2.38 \%$  a una concentración de 11.712  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, a las concentraciones de 37.5 y 58.56  $\mu\text{M}$  se observó una disminución del efecto inhibitorio (Figura 14). Estos resultados, sugieren que Cas III ia tiene un comportamiento tipo antagonista parcial, aunque presenta una potencia de 18.8 veces mayor que empagliflozina.



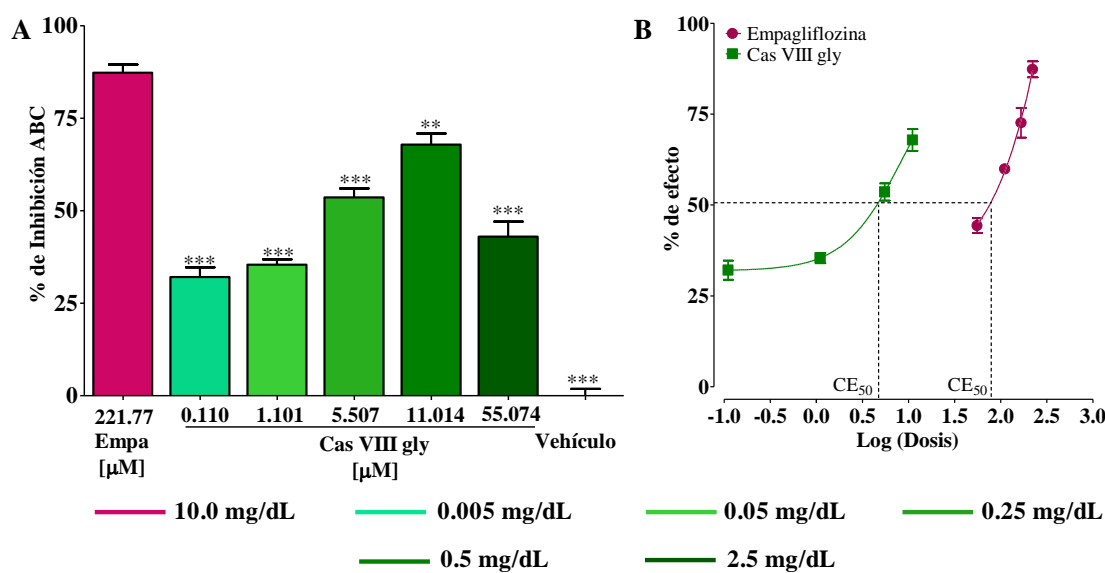
**Figura 14. Inhibición *in vitro* de la absorción de glucosa por efecto de Cas III ia.** En A se muestra el efecto de Cas III ia expresado como porcentajes de inhibición. B. Curvas dosis-respuesta de Cas III ia y Empagliflozina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n=6$  sacos. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  con respecto al control de empagliflozina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis (mg/dL) al que corresponde cada tratamiento.

La evaluación de Cas VI gly mostró que también posee una actividad inhibitoria dosis-dependiente (Figura 15A). Se observaron diferencias significativas en todas las concentraciones evaluadas al ser comparadas con el vehículo utilizado para el tratamiento. La eficacia máxima de inhibición para este compuesto fue de  $72.70 \pm 1.37 \%$  a una concentración de 11.740  $\mu\text{M}$ , dejando en evidencia que su comportamiento es de tipo antagonista parcial y posee casi 19 veces mayor potencia que empagliflozina.



**Figura 15. Inhibición *in vitro* de la absorción de glucosa por efecto de Cas VI gly.** En A se muestra el efecto de Cas VI gly expresado como porcentajes de inhibición. B. Curvas dosis-respuesta de Cas VI gly y Empagliflozina. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una n=6 sacos. \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 con respecto al control de empagliflozina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en (mg/dL) al que corresponde cada tratamiento.

En cuanto a Cas VIII gly, se observó que posee un efecto estadísticamente significativo en todas las concentraciones evaluadas y la inhibición se presenta de forma dosis dependiente. El efecto máximo de inhibición alcanzado ( $68.54 \pm 3.67$  %) se produjo a la concentración de 11.014  $\mu$ M, con un comportamiento de tipo antagonista parcial, pero con mayor potencia que empagliflozina.



**Figura 16. Inhibición *in vitro* de la absorción de glucosa por efecto de Cas VIII gly.** A. Efecto expresado como porcentajes de inhibición. B. Curva dosis-respuesta. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n=6$  sacos. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$  con respecto al control de empagliflozina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en (mg/dL) al que corresponde cada tratamiento.

En la Tabla 11, se resumen los resultados de eficacia máxima y potencia relativa obtenidos de las CDR para cada compuesto. Los resultados muestran que las Casiopeínas presentan una eficacia máxima aproximadamente del 70%, sugiriendo que estos compuestos se comportan como antagonistas parciales en este modelo. Por otro lado, la empagliflozina mostró la mayor eficacia ( $87.30 \pm 2.22$ ) a la concentración de  $77.65 \mu\text{M}$ . Sin embargo, en el rango de concentraciones evaluadas no se alcanzó su eficacia máxima.

En cuanto a la potencia ( $CE_{50}$ ), se encontró que con respecto a empagliflozina las Casiopeínas (en orden decreciente): Cas III Ha, Cas III ia, Cas VI gly y Cas VIII gly, son más potentes inhibiendo la absorción de glucosa. La potencia relativa nos muestra que las Casiopeínas son hasta 49 veces más potentes que empagliflozina.

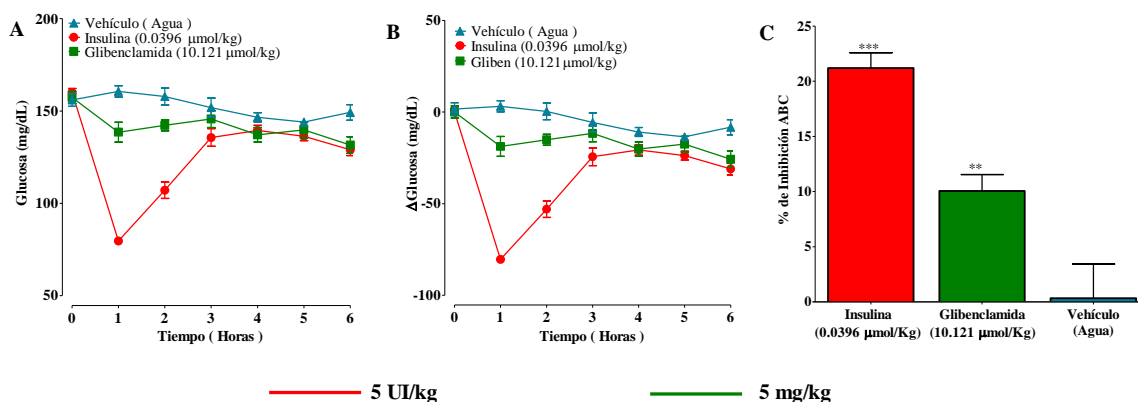
**Tabla 11. Eficacia máxima (Emáx) y potencia de las Casiopeínas evaluadas en el modelo de absorción intestinal de glucosa *in vitro*.**

Tratamiento	Eficacia máxima (Emáx)	CE <sub>50</sub> (μM)	Potencia relativa
Empagliflozina	87.30 ± 2.22	77.65	1.0
Cas VI gly	72.70 ± 1.37 <sup>ns</sup>	1.581	49.09
Cas III ia	72.72 ± 2.38 <sup>ns</sup>	2.523	30.76
Cas III Ha	73.08 ± 4.58 <sup>ns</sup>	3.206	24.21
Cas VIII gly	68.54 ± 3.67 <sup>ns</sup>	4.335	17.91

Cada punto representa el promedio ± SEM de una n=6 sacos. ns: no significativo con respecto al control de empagliflozina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet.

### 7.3 Actividad hipoglucemiante en ratones CD1 normoglucémicos

Para determinar si las Casiopeínas poseen efecto sobre la utilización sistémica de la glucosa, se validó el modelo hipoglucemiante en ratones CD1, utilizando como control positivo la insulina y glibenclamida. En la Figura 17A se muestra el curso temporal de la evaluación hipoglucémica de insulina (0.0396 μmol/kg), Glibenclamida (10.121 μmol/kg) y del vehículo. En tanto, la Figura 17B muestra los resultados en deltas totales (Δglucosa mg/dL). La administración de insulina disminuyó los niveles de glucosa en un 51.66 ± 0.76% a los 60 min, regresando gradualmente a los niveles basales de glucosa a partir de la cuarta hora, con una regulación global de la glucemia del 21.20 ± 1.24%. En contraste de la regulación rápida por parte de la insulina, el control de glibenclamida actuó gradualmente reduciendo los niveles de glucemia, sin un pico pronunciado de hipoglucemia a los 60 minutos (5.93 ± 2.92%), reduciendo de forma global un 10.06 ± 1.33% (Figura 17C). Estas diferencias entre los porcentajes de disminución de la glucemia de la insulina y glibenclamida se deben principalmente a las características propias del fármaco y a sus mecanismos de acción.



**Figura 17. Cinéticas del efecto hipoglucemiante de insulina, Glibenclamida y agua en ratones CD1** En A y B se observan los cursos temporales. En C el efecto hipoglucemiante expresando en porcentaje del ABC. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n=6$  animales. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$  con respecto al vehículo de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en mg/kg o UI/kg al que corresponde cada tratamiento.

Una vez estandarizados los controles, se realizó un ensayo bajo las mismas condiciones experimentales para determinar cuál de las Casiopeínas presentaba mejor actividad hipoglucemiante, evaluándolas a una dosis de 1.0 mg/kg. Con estos resultados se calcularon los porcentajes de disminución al pico máximo (1 hora) y la disminución de ABC, comparados con el vehículo respectivamente. En la Tabla 12, se ordenan los compuestos de mayor a menor actividad hipoglucemiante respecto al pico máximo de inhibición alcanzando por insulina.

**Tabla 12. Porcentaje de disminución en la actividad hipoglucemiante calculados respecto al pico máximo y al ABC para las Casiopeínas.**

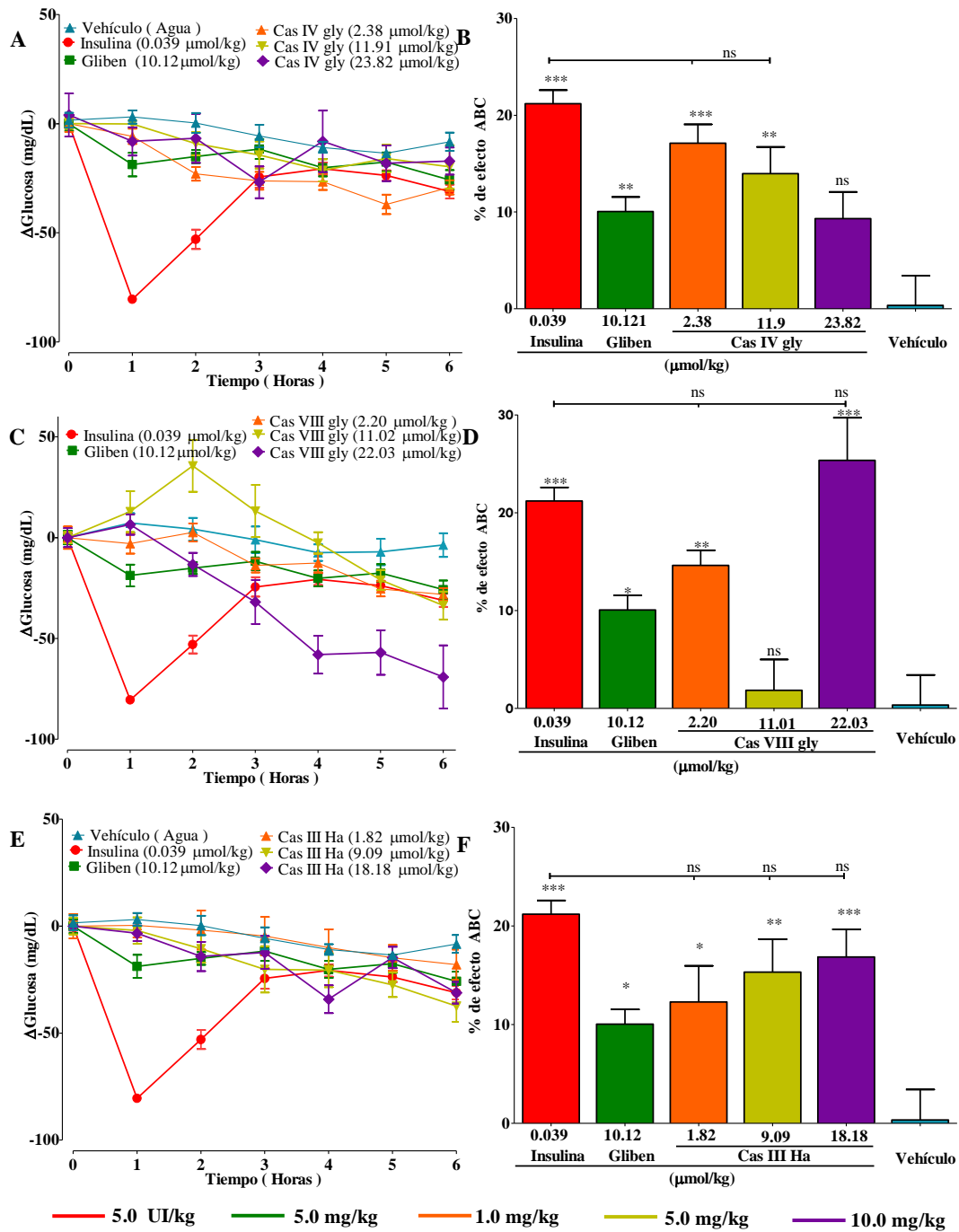
Controle	Con					
	[ $\mu\text{mol/kg}$ ]		% ABC			
Insulina	0.040		21.20 $\pm$ 1.24			
Glibenclamida	10.12		10.06 $\pm$ 1.33*			
Vehículo	-		0.34 $\pm$ 2.76***			

tratamientos	Con		Conc		Conc	
	[ $\mu\text{mol/kg}$ ]	% ABC	[ $\mu\text{mol/kg}$ ]	% ABC	[ $\mu\text{mol/kg}$ ]	% ABC
Cas IV gly	2.38	17.12 $\pm$ 1.59ns	11.91	13.97 $\pm$ 2.25ns	23.82	9.32 $\pm$ 2.76**
Cas VIII gly	2.20	14.61 $\pm$ 1.26ns	11.02	3.91 $\pm$ 2.39***	22.03	25.35 $\pm$ 3.85ns
Cas II gly	2.35	13.02 $\pm$ 3.44ns	11.74	18.11 $\pm$ 2.40ns	23.48	15.71 $\pm$ 1.51ns
Cas III Ha	1.82	12.30 $\pm$ 2.98ns	9.09	15.33 $\pm$ 2.72ns	18.18	16.85 $\pm$ 2.39ns
Cas VI gly	2.35	11.24 $\pm$ 2.00*	11.74	16.73 $\pm$ 5.64ns	23.5	- 7.59 $\pm$ 5.86***
Cas III ia	2.34	10.74 $\pm$ 4.85*	11.71	10.21 $\pm$ 3.31**	23.42	2.11 $\pm$ 2.85**
Cas I gly	1.82	10.51 $\pm$ 2.57*	9.09	13.87 $\pm$ 2.01*	18.18	2.46 $\pm$ 4.54**
Cas III La	2.14	9.56 $\pm$ 3.64*	10.69	15.72 $\pm$ 5.27ns	21.65	11.32 $\pm$ 2.63*
Cas III Ea	2.23	9.06 $\pm$ 3.21*	11.14	7.94 $\pm$ 4.50**	22.28	14.25 $\pm$ 0.57ns
Cas III Ma	2.17	2.33 $\pm$ 3.95***	10.82	4.19 $\pm$ 0.98**	21.65	7.61 $\pm$ 2.29**

Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una n=6 animales \* P <0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 ns: no significativo con respecto al control de insulina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Para las Casiopeínas las dosis de 1.8 – 2.3, 9.0 -11.9 y de 18.0 -23.8  $\mu\text{mol/kg}$ , corresponden a 1.0, 5.0 y 10 mg/kg, respectivamente.

Se evaluaron tres concentraciones de los tres compuestos hipoglucemiantes más activos correspondientes al ABC; Cas VIII gly, Cas III Ha y Cas IV gly, para determinar si su efecto es dosis-dependiente. En la Figura 19, se observan las cinéticas en deltas totales de cada uno de estos compuestos y los porcentajes de efecto hipoglucemiante de las concentraciones evaluadas para cada compuesto.



**Figura 18. Evaluación del efecto hipoglucémico de las Casiopeínas Cas IV gly, Cas VIII gly y Cas III La en ratones CD1 normoglicémicos.** A, C y E. Cursos temporales en deltas totales ( $\Delta\text{glucosa mg/dL}$ ). B, D y F. Porcentajes de efecto hipoglucémico para cada tratamiento, respectivamente. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n=6$  animales \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  ns: no significativo con respecto al control de insulina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnett. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en mg/kg o UI/kg al que corresponde cada tratamiento.

La evaluación de Cas IV gly (Figura 18 A-B) exhibió que su efecto hipoglucemiante es dosis dependiente inverso, el máximo efecto hipoglucémico calculado correspondiente al ABC fue de  $(17.12 \pm 1.59 \%)$  y se alcanzó con una dosis de  $2.382 \mu\text{mol/kg}$ . Al comparar el efecto hipoglucémico de Cas IV gly, con el que posee la insulina ( $21.20 \pm 1.24 \%$ ), no se observan diferencias estadísticamente significativas con las dosis de  $2.382 (17.12 \pm 1.59 \%)$  y  $11.908 (13.97 \pm 2.25 \%) \mu\text{mol/kg}$ . Sin embargo, el efecto con estas dosis fue mayor al efecto producido por glibenclamida ( $10.06 \pm 1.33 \%$ ) a dosis de  $10.121 \mu\text{mol/kg}$ .

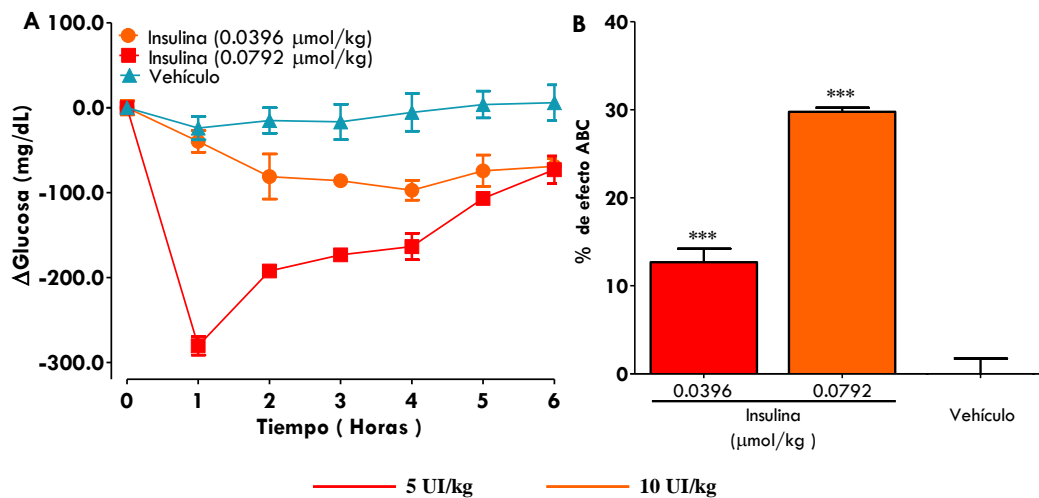
Los resultados encontrados para Cas VIII gly, respecto al ABC (Figura 18 C-D), muestran que su actividad hipoglucemiante es dependiente de la dosis, con excepción de la dosis de  $11.015 \mu\text{mol/kg}$ , en donde este efecto se encontró sustancialmente disminuido. No obstante, la dosis de  $22.030 \mu\text{mol/kg}$ , presentó un efecto hipoglucemiante de  $25.38 \pm 3.85\%$ , que se encuentra por arriba del efecto que presenta la insulina. El análisis estadístico confirma que no existen diferencias significativas entre los efectos mostrados con insulina y Cas VIII gly a esta dosis.

En cuanto a los resultados obtenidos para el compuesto Cas III Ha (Figura 18 E-F), se observó una actividad hipoglucémica dependiente de la dosis. El efecto presenta diferencias estadísticamente significativas a todas las dosis evaluadas al ser comparados con el vehículo de los tratamientos. El efecto que presentó este compuesto en las tres dosis evaluadas no tuvo diferencias significativas con el efecto exhibido por la insulina correspondientes al ABC, respectivamente. Alcanzando su efecto máximo ( $16.85 \pm 2.39 \%$ ) con una dosis de  $18.180 \mu\text{mol/kg}$ . Todas las dosis evaluadas de estos compuesto mostraron mayor actividad hipoglucémica que la glibenclamida.

La evaluación de las actividades: anti hiperglucémica, inhibición de la absorción intestinal de glucosa y el efecto hipoglucemiante, permitió seleccionar a los compuestos más prometedores para evaluarlos en modelos diabéticos: Cas III Ha, Cas III La, Cas VI gly y Cas VIII gly.

#### 7.4 Actividad hipoglucemiante de las Casiopeínas en ratones diabéticos CD1.

Para este modelo se indujeron ratones CD1 machos, con aloxano (220 mg/kg), considerándolos diabéticos después de dos semanas con niveles de glucosa superiores a los 350 mg/dL. Se validó el modelo evaluando el curso temporal de la insulina utilizada como control positivo a concentraciones de 0.0396 y 0.0792  $\mu\text{mol/kg}$  y el vehículo utilizado para cada tratamiento, midiendo los niveles de glucosa durante 6 horas con intervalos de 1 hora (Figura 19).



**Figura 19. Cinéticas hipoglucemiantes del control de insulina (0.0396 y 0.0792  $\mu\text{mol/kg}$ ) y el vehículo utilizado en cada tratamiento.** Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n=3$  animales. \*\*\*  $P<0.001$  con respecto al vehículo de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en UI/kg al que corresponde cada tratamiento.

Las cinéticas de esta evaluación permiten observar que insulina a la concentración de 0.0396  $\mu\text{mol/kg}$  no produce ningún pico hipoglucémico, contrario a lo observado en el modelo normoglucémico a la misma concentración, sin embargo, si logra descender los niveles de glucosa de manera gradual. En tanto, a una concentración de 0.0792  $\mu\text{mol/kg}$ , se observa pico hipoglucémico ( $49.55 \pm 1.44$  %) prominente a los 60 minutos después de la administración, no obstante, los niveles de glucosa empiezan a ascender a partir de la segunda

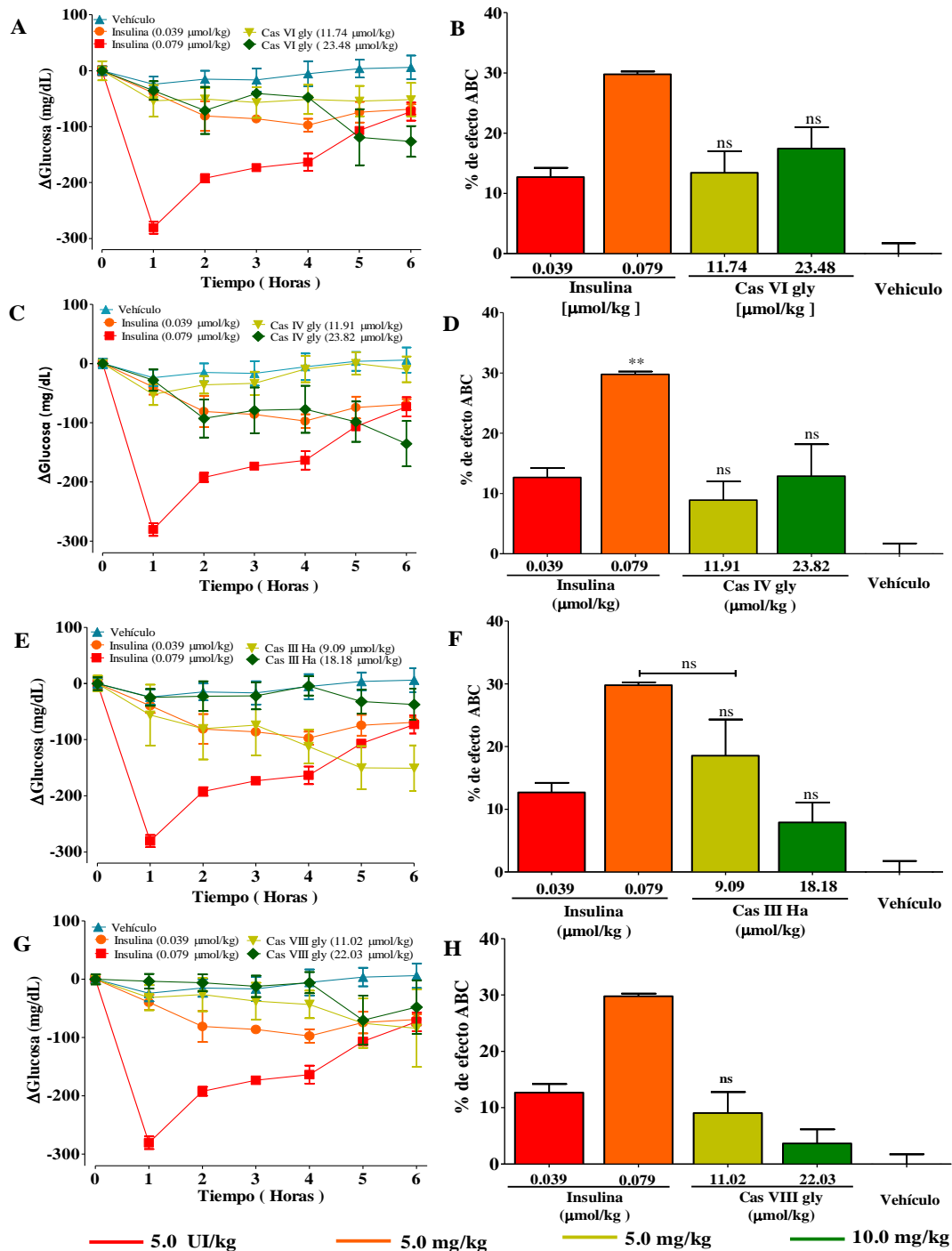
hora (Figura 19A). A partir del ABC de las cinéticas, se calcularon los porcentajes de efecto hipoglucémico para cada concentración. Las dosis de insulina 0.0396 y 0.792  $\mu\text{mol/kg}$ , poseen un efecto hipoglucemiante de  $12.68 \pm 1.53$  y  $29.77 \pm 0.47$  % respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas contra el vehículo utilizado para cada tratamiento (Figura 19). Para demostrar si las Casiopeínas también poseen un efecto hipoglucémico en el modelo diabético, se evaluaron los compuestos más prometedores anteriormente seleccionados: Cas III Ha, Cas III La, Cas VI gly y Cas VIII gly. Con el ABC de los cursos temporales se calcularon los porcentajes de efecto hipoglucémico para cada compuesto a las concentraciones evaluadas (Tabla 13).

**Tabla 13. Porcentaje de disminución en la actividad hipoglucemiante en ratones diabéticos CD1.**

Tratamiento	Dosis [ $\mu\text{mol/Kg}$ ]	% Efecto ABC	Concentración [ $\mu\text{mol/Kg}$ ]	% Efecto ABC
Vehículo	-	$0.0 \pm 1.41$	-	$0.0 \pm 1.41$
Insulina	0.0396	$12.68 \pm 1.53$	0.0792	$29.77 \pm 0.47$
Cas III Ha	9.090	$18.53 \pm 5.77\text{ns}$	18.180	$7.88 \pm 3.16^{**}$
Cas VI gly	11.740	$11.95 \pm 4.26\text{ns}$	23.481	$17.44 \pm 2.05\text{ns}$
Cas IV gly	11.908	$8.91 \pm 3.10\text{ns}$	23.481	$12.90 \pm 5.27\text{ns}$
Cas VIII gly	11.015	$9.05 \pm 3.73\text{ns}$	22.030	$3.64 \pm 2.52^{***}$
Cas III La	10.685	$2.71 \pm 2.60^{***}$		----
Cas II gly	11.740	$1.66 \pm 6.40^{***}$		----

Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n= 3$  animales. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  ns: no significativo con respecto al control de insulina de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Para las Casiopeínas las dosis de 9.0 -11.9 y de 18.0 -23.4  $\mu\text{mol/kg}$ , corresponden a 5.0 y 10 mg/kg, respectivamente.

En la Figura 20, se observan las cinéticas en deltas totales de cada uno de estos compuestos y los porcentajes de efecto hipoglucemiante de las concentraciones evaluadas para cada compuesto.



**Figura 20. Evaluación del efecto hipoglucémico de las Casiopeínas Cas VI gly, Cas IV gly y Cas III Ha en ratones CD1 diabéticos.** A, C y E. Cursos temporales en deltas totales ( $\Delta$ glucosa mg/dL). B, D y F. Porcentaje de efecto hipoglucémico para cada tratamiento. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM de una  $n=3$  animales. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  ns: no significativo con respecto al control de insulina (0.0396  $\mu$ g/kg) de cada tratamiento por ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet. Las líneas de colores en la parte inferior de las gráficas indican la dosis en mg/kg o UI/kg al que corresponde cada tratamiento.

Los resultados del ABC, para los cursos temporales de los compuesto Cas IV gly y VI gly muestran que su efecto es dosis dependiente. En los dos compuestos ambas dosis evaluadas no presentaron diferencias significativas, respecto al efecto alcanzado con el control de insulina a dosis de 0.0396  $\mu\text{mol/kg}$  ( $12.68 \pm 1.53$ ). El efecto máximo para Cas VI gly (23.481  $\mu\text{mol/kg}$ ) y Cas IV gly (23.817  $\mu\text{mol/kg}$ ) fue de  $17.44 \pm 2.05$  y  $12.90 \pm 5.27$  %, respectivamente.

De manera contraria, el compuesto Cas III Ha presentó un efecto dosis dependiente inverso, aunque al ser comparadas con el efecto de insulina a dosis de 0.0396  $\mu\text{mol/kg}$  ( $12.68 \pm 1.53$  %) ambas concentraciones no presentaron diferencias significativas. Particularmente este compuesto a dosis de 9.090  $\mu\text{mol/kg}$  alcanzó su efecto máximo ( $18.53 \pm 5.77$  %). El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre el efecto producido por 9.090  $\mu\text{mol/kg}$  de Cas III Ha y el efecto hipoglucemiante que presentó la insulina ( $29.77 \pm 0.47$  %) a una dosis de 0.0792  $\mu\text{mol/kg}$ .

## 8.0 DISCUSIÓN

### 8.1 Actividad anti-hiperglucemiante

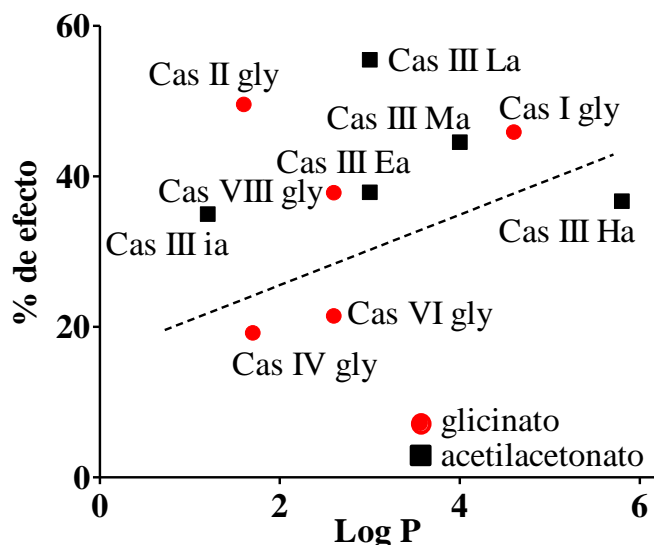
#### 8.1.1 Actividad anti-hiperglucemiante *in vivo* de las Casiopeínas en un modelo de hiperglucemia inducida por almidón.

La diferencia entre el nivel de glucosa en sangre posprandial y preprandial en diferentes puntos de tiempo ( $\Delta$ Glucosa), juega un papel importante en la hiperglucemia total por lo que se ha sugerido su control como un nuevo enfoque terapéutico para minimizar los efectos adyacentes inducidos por la hiperglucemia y el control del desarrollo de complicaciones. Nuestro modelo de hiperglucemia inducida con almidón permite simular y seguir el proceso de digestión, absorción y utilización de los carbohidratos. De esta manera es fácil medir los cambios en los niveles de glucosa tras la administración de fármacos inhibidores de la digestión o absorción. En las cinéticas estudiadas en este trabajo, la digestión del almidón inicia desde el momento de la administración. En los primeros 15 minutos se observa una digestión parcial efectuada por la amilasa pancreática que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos de los polisacáridos. La digestión total de los polisacáridos en glucosa ocurre a los 30 minutos (pico máximo:  $37.27 \pm 3.18$  mg/dL) por la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,6 glucosídicos bajo acción de las  $\alpha$ -glucosidasas. Estos valores concuerdan con los reportados en diferentes ensayos tras la administración de almidón para inducción de hiperglucemia <sup>95,32,96,97</sup>.

Después de la digestión del almidón, la glucosa es absorbida a nivel apical en los enterocitos por un mecanismo de transporte activo mediado por los SGLT1 y con ayuda de los GLUT2 entra a circulación sistémica para su utilización y activa mecanismos en respuesta al incremento de glucosa como la secreción de insulina. Lo anterior permite regular los niveles glucémicos (a partir del minuto 30) favoreciendo su captación y almacenamiento, hasta regresar a sus niveles basales (minuto 120). En lo que respecta a los compuestos de coordinación, los efectos anti-hiperglucémicos observados pueden explicarse al dividir los compuestos en dos grupos; 1) los que en su esfera de coordinación poseen un ligante glicinato y 2) los que poseen un acetilacetato. Agrupados de esta manera la capacidad anti hiperglucémica determinada a los 30 minutos, que es donde se presenta el pico

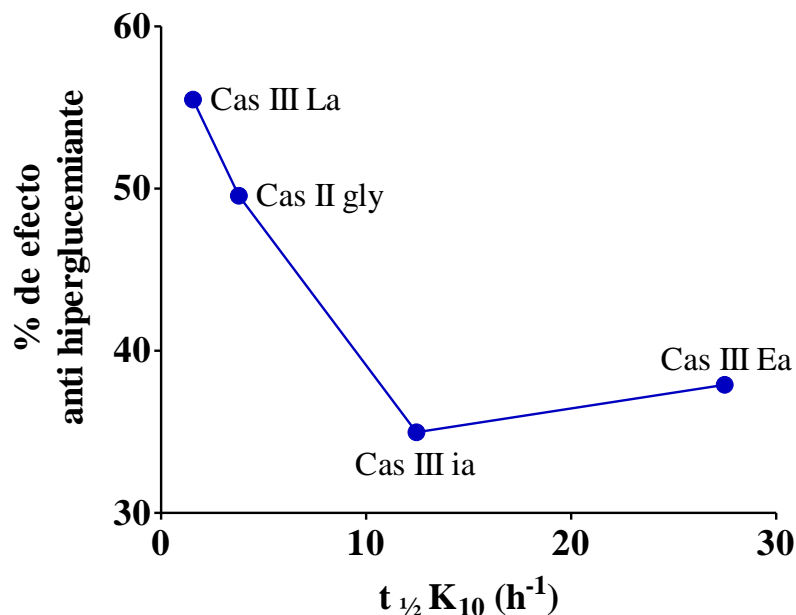
hiperglucémico inducido por la administración de almidón de maíz, se presenta en el siguiente orden por grupo: 1) glicinato: Cas II gly  $\approx$  Cas I gly > Cas VIII gly > Cas VI gly  $\approx$  Cas IV gly; y 2) acetilacetato; Cas III Ha > Cas III Ma > Cas III Ea > Cas III Ia  $\approx$  Cas III ia. En ambos grupos, el compuesto que fue menos efectivo tiene en su esfera de coordinación el ligante 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina. En cuanto a su estructura, los compuestos que resultaron más activos en ambos grupos poseen una fenantrolina en la esfera de coordinación de metal. En el caso de los compuestos con fenantrolina en su esfera de coordinación, la actividad anti-hiperglucemiante se modifica en función de la naturaleza y posición de los sustituyentes de la diimina.

Se observa que la actividad de estos compuestos puede estar relacionada con su carácter hidrofóbico/hidrofílico (log P) (Tabla 6), responsable también de modular su distribución. La Figura 21 muestra que, de manera general, al aumentar el carácter hidrofóbico aumenta su actividad anti-hiperglucemiante. La excepción a la tendencia general la presenta el compuesto Cas II gly, la diferencia podría deberse a una mejor distribución aparente entre las capas lipídicas de las membranas, reflejándose en la velocidad con la que llega a su sitio de acción en las enzimas  $\alpha$  - glucosidasas.



**Figura 21. Distribución de la relación del Log p y el efecto antihiperglucemiante.** Como tendencia general las Casiopeínas exhiben que a medida que aumenta el Log P aumenta el efecto antihiperglucemiante. Los círculos rojos hacen referencia a los compuestos con un ligante glicinato y los cuadros negros aquellos que tienen en su estructura acetilacetato.

De lo anterior, es posible sugerir una relación directa entre el efecto observado y velocidad de biodistribución obtenida en estudios farmacocinéticos previamente publicados para algunos compuestos (Tabla 5). La velocidad con la que alcanzan estos compuestos su biodistribución lo podemos comparar con el tiempo de vida media. Para los compuestos Cas III La, Cas II gly, Cas III ia y Cas III Ea, el valor de  $t_{1/2} K_{10} (h^{-1}) = 1.56, 3.8, 12.46$  y  $27.49$ , respectivamente. Este valor parece presentar la misma tendencia que el efecto correspondiente al punto máximo de inhibición de la digestión de glucosa a los 30 min, donde Cas III La presenta un Cas III La 55.49%, Cas II gly 49.56%, Cas III ia 34.98% y Cas III Ea 37.9%, en este sentido, entre más rápido alcancen su biodistribución el efecto antihiperglucemiante que alcanza es mayor.



**Figura 22. Distribución de la relación del  $t_{1/2} K_{10} (h^{-1})$  y el efecto antihiperglucemiante.** En la gráfica se observa un relación directa entre la vida media de las Casiopeínas y su efecto, en donde, más rápido alcancen su biodistribución el efecto antihiperglucemiante que alcanza es mayor.

El segundo punto que se analizó fue el efecto de la inhibición de la digestión, calculado a partir del ABC de los cursos temporales, en donde, los compuestos con carácter más hidrofílico resultaron ser los que redujeron en mayor medida su efecto sobre la inhibición de la digestión entre un 55 y 100 %, a diferencia de los más hidrofóbicos que solo redujeron

entre un 20 y 50 % de su efecto. Esta diferencia en los porcentajes de pérdida de efecto relacionadas con el carácter hidrofóbico / hidrofílico puede deberse a que los compuestos hidrofóbicos se difunden más lentamente fuera de la bicapa, no así para los compuestos más hidrofílicos que se difunden rápidamente, impidiendo que permanezcan el tiempo suficiente para interactuar con el sitio de acción en las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas.

En cuanto a los controles utilizados, como era de esperarse, la administración de acarbosa tuvo el máximo efecto sobre esta actividad inhibiendo significativamente el pico hiperglucémico inducido por la administración de almidón. La acarbosa bloquea la digestión a nivel intestinal por medio de una inhibición reversible y competitiva tanto de las enzimas  $\alpha$ -amilasa pancreática y las  $\alpha$ -glucosidasas en el borde de cepillo de los enterocitos. La gran eficacia observada se debe a su alta selectividad y capacidad de formar un gran número de interacciones intermoleculares, principalmente puentes de hidrógeno, con su diana terapéutica. Los puentes de hidrógeno se forman con los residuos de aminoácidos que se encuentran en la región catalítica de las  $\alpha$  glucosidasas.

A saber, que, cada molécula de esta enzima está formada por 1867 residuos de aminoácidos y contiene dos subunidades catalíticas homólogas. El dominio N-terminal (NtMGAM) y el dominio C-terminal (CtMGAM). Ambas subunidades llevan a cabo la reacción catalítica: hidrólisis de unidades de almidón a unidades de glucosa (monómeros)<sup>31</sup>. En tanto que, los dos primeros anillos del extremo no reductor de acarbosa ocupan los subsitios de azúcar -1 y +1 del sitio activo, con el enlace N- ocupando el centro catalítico de estas enzimas. La única diferencia entre la unión de la acarbosa y un sustrato tetrasacárido unido a  $\alpha$ -(1,4 o 6) con el único sitio activo de la enzima es el átomo de nitrógeno de la acarbosa en lugar de un átomo de oxígeno del carbohidrato. De esta manera la acarbosa evita la unión de oligosacáridos, produciendo un retraso del pico máximo de absorción y mitigando las fluctuaciones de la glucosa postprandial<sup>30</sup>.

Existen antecedentes generados en otros estudios sobre la actividad anti hiperglucemiante de diferentes compuestos, que han sugerido que la actividad biológica se encuentra relacionada directamente con su estructura química del compuesto<sup>98</sup>. Es decir, que todos estructuralmente tienen en común un glúcido (generalmente un monosacárido) unido a un compuesto no glúcídico o un grupo fenil hidroxilo<sup>99,98,100</sup>, que son fundamentales para la actividad anti

hiperglucémica. Otra clase de análogos glucosídicos con potencial actividad inhibidora enzimática reportados son los disacáridos C. En estos compuestos, un enlace glucosídico C se sustituye por el enlace O habitual, pero son similares a los disacáridos y asumen conformaciones similares a estos sustratos naturales, capaces de imitar patrones estructurales necesarios para favorecer el estado de transición enzimático de las  $\alpha$  glucosidasas<sup>101</sup>. Aunado a esto, otros estudios consideran que los amino azúcares, tienen un valor terapéutico potencial, su especificidad está relacionada con su capacidad para imitar unidades de piranósidos o furanósidos en estado de transición de sustratos de glucosidasa natural, sugiriendo que las influencias conformaciones y electrostáticas pueden ser importantes en la unión del sitio activo.

Con todos los antecedentes estructurales generados en relación con los inhibidores de estas enzimas, se sugiere que la fenantrolina podría participar en la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas. Es posible sugerir que los átomos de nitrógeno y oxígeno que existen en las Casiopeínas con los subsitios de azúcar -1 y +1 activos de las  $\alpha$ -glucosidasas o interactuar en las cercanías de este a través del cobre, mediante enlaces de tipo puentes de hidrógeno. Teniendo en cuenta que la escisión parcial del enlace glucosídico intensifica la carga positiva generada en el oxígeno o el carbono anomérico de las unidades de glucosa, la sustitución de uno de los átomos por nitrógeno protonado imitará la carga en estos centros activos, actuando entonces como un antagonistas competitivo e inhibiendo la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -(1,4 o 6) del polisacárido.

Aunque el efecto de las Casiopeínas más activas como antihiperglucemiante no tuvo diferencias significativas frente al efecto de la acarbosa, sus cinéticas de actividad durante todo el curso temporal analizado son más semejantes a las cinéticas que presentó la empagliflozina, que, a diferencias de la acarbosa, inhibe la absorción de glucosa mediante el bloqueo de los cotransportadores sodio-glucosa (SGLT) situados tanto en el intestino como en el riñón. Dando pie a la posibilidad de que estos compuestos también tengan efecto sobre estos cotransportadores. Por ello, se analiza el efecto de las Casiopeínas en un modelo *in vitro* de absorción de glucosa en sacos intestinales invertidos.

### **8.1.2 Evaluación de la absorción intestinal de glucosa *in vitro* de las Casiopeínas en el modelo de saco intestinal invertido de rata**

Otro de los objetivos terapéuticos en la DM2, se basa en la inhibición de la absorción y promoción de la excreción urinaria de glucosa como un enfoque prometedor para reducir la hiperglucemia inducida después de ingerir carbohidratos. De manera regular, la glucosa es transportada por los cotransportadores de glucosa dependientes de sodio (SGLT) a través de la membrana luminal, siendo SGLT<sub>1</sub> y SGLT<sub>2</sub> la vía principal para la absorción y reabsorción, en intestino y riñón, respectivamente<sup>102</sup>. En este contexto, se buscan fármacos capaces de bloquear estos cotransportadores.

El modelo de saco intestinal invertido permite evaluar la capacidad que tienen diferentes compuestos para inhibir la absorción intestinal de glucosa. Se validó empleando como control positivo la empagliflozina, un inhibidor potente, competitivo y selectivo del transportador de sodio glucosa, pertenece a la familia de los glucósidos C<sup>103</sup>. Esta característica estructural le permite unirse a la región activa de los dominios transmembranales (2 a 4; 7 a 9, y 11) contribuyendo a la interacción con el ligando, e inhibiendo de manera irreversible la unión de glucosa a los SGLT<sup>102</sup>. Lo anterior da como resultado reducciones posteriores en las concentraciones de glucosa en plasma y hemoglobina glucosilada<sup>104</sup>.

La evaluación de empagliflozina demostró que su efecto es dosis dependiente, bajo el mecanismo de acción ya descrito. Por otro lado, todos los compuestos de coordinación evaluados exhibieron inhibición de la absorción de glucosa en el modelo de saco intestinal. Los compuestos más eficaces son; Cas III Ha, Cas III ia, Cas VI gly y Cas VIII gly. Al calcular la DE<sub>50</sub> para cada compuesto, se encontraron potencias relativas de 18 a 49 veces por arriba de empagliflozina en un rango de concentraciones de 1.5 a 4.3 μM (Tabla 11). Aún no se conoce el mecanismo de acción molecular por el cual ejercen su efecto. Sin embargo, en relación con la actividad anti hiperglucemiante que presentaron algunos de estos compuestos, es posible asociar su efecto con la unión al sitio de acción del SGLT o por un efecto alostérico. De manera particular Cas III Ha, Cas I gly y Cas VIII gly, exhibieron un efecto análogo al de los controles positivos, en las dos actividades evaluadas hasta este punto, por tanto, es posible inferir que las tres Casiopeínas pueden afectar la actividad tanto de las enzimas α-glucosidasas como de los cotransportadores de glucosa dependientes de sodio.

La pérdida de efecto inhibitorio de los compuestos de coordinación podría ser explicada, considerando la saturación de los sitios de unión, es decir, cuando la concentración de fármaco es elevada, la cantidad que se fija tiende a un límite superior que viene dado por el número de sitios de unión disponible o como se ha visto para algunas Casiopeínas, que a altas concentraciones forman precipitados estructurales, lo que impide que se pueda absorber.

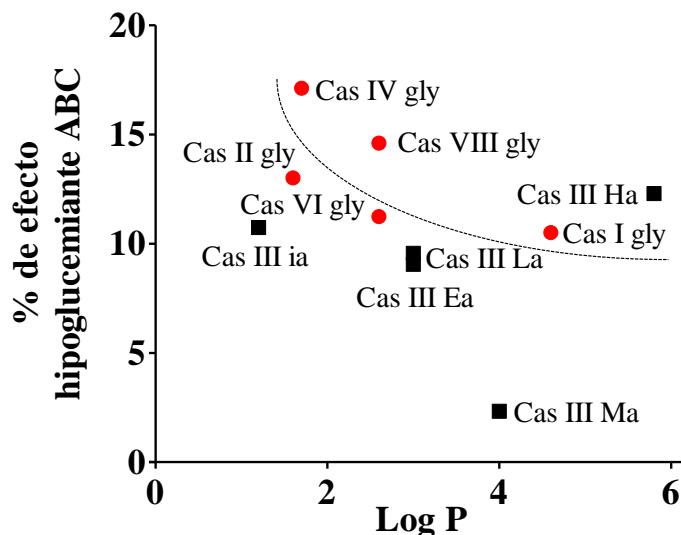
## **8.2 Actividad hipoglucemiante en ratones CD1 normoglucémicos**

Hasta el momento se han propuestos los posibles mecanismos por los que las Casiopeínas han expuesto un efecto sobre la regulación de glucosa. Sin embargo, al mismo tiempo en el que se llevan a cabo la digestión y absorción, están ocurriendo los procesos de metabolismo y utilización sistémica de glucosa, por lo que se trata de un proceso dinámico y complejo que involucra diferentes mecanismos como la activación de la vía de señalización de insulina. Para evaluar la utilización sistémica de glucosa, se usó el modelo hipoglucemiante en animales sanos con actividad del páncreas intacto, para probar el potencial hipoglucemiante de los compuestos.

Se evaluaron como control positivo a la insulina y glibenclamida (secretagogo de insulina) para tener un punto de comparación entre las cinéticas obtenidas de estos mecanismos y el efecto en este sistema de las Casiopeínas. De acuerdo con lo esperado, la administración i.v de insulina de acción intermedia, mostró su efecto máximo ( $51.66 \pm 0.76\%$ ) con un pico hipoglucémico muy marcado a los 60 min, con una regulación global de la glucemia del  $21.20 \pm 1.24\%$ , por acción directa sobre el IR estimulando un aumento directo en la utilización de glucosa y disminución hepática de la misma.

A diferencia de esta regulación rápida, la glibenclamida actúa intensificando la liberación de insulina por acción sobre los canales de potasio sensibles a ATP en la subunidad receptora de sulfonilureas (SUR). Es posible inferir, por el tipo de cinética que presentó la glibenclamida, que la liberación de insulina es progresiva y proporcional a los niveles de glucosa existentes en el modelo, reduciendo el ABC de glucemia en un  $10.06 \pm 1.33\%$ , sin un pico pronunciado de hipoglucemia.

En el primer ensayo con los compuestos de coordinación (Tabla 12.), al comparar el efecto de todos los compuestos en el punto máximo hipoglucemiante (60 min) que se observó con insulina, ninguno de ellos presentó algún efecto significativo frente a la insulina. No obstante, al comparar los efectos resultantes del ABC, todos los compuestos evaluados exhiben un efecto similar a insulina, e incluso en la mayoría de los casos, mejor que el efecto mostrado por glibenclamida. Para este sistema los compuestos con fenantrolina con glicinato presentaron mejor efecto, y a medida que aumenta la hidrofobicidad disminuye el efecto, es posible que este orden de efecto se deba a la mayor disposición/biodisponibilidad que poseen los compuestos con mayor carácter hidrofílico al encontrarse una disolución acuosa como el plasma y a la velocidad de distribución que presentan en este estado.



**Figura 23 Distribución de la relación entre el log p y el efecto hipoglucemiante.** Como tendencia general las Casiopeínas exhiben que a medida que aumenta el Log P disminuye el efecto hipoglucemiante. Los círculos rojos hacen referencia a los compuestos con un ligante glicinato y los cuadros negros aquellos que tienen en su estructura acetilacetonato.

De los compuestos más activos; Cas IV gly, Cas VIII gly y Cas III Ha (Figura 17.) se evaluaron dos concentraciones más para determinar que su efecto era dosis-dependiente. Las cinéticas que presentaron los compuestos Cas IV gly y Cas III Ha son similares a la de glibenclamida. La glibenclamida posee sustituyentes NH o residuos nitrogenados de la fracción de urea que actúan como sitio de reconocimiento para el acoplamiento en la fracción

Kir.6.2 de SUR1, y se podría especular que los átomos de N de la fenantrolina, pero sobre todo los grupos amino del glicinato, forman de alguna manera estos mismos enlaces. Por otro lado, la cinética de Cas VIII gly muestran un efecto similar al de insulina, pero sin picos hipoglucémicos, con un descenso gradual pero significativamente igual del ABC ( $\mu\text{mol/kg}$ ). Existen antecedentes generados de otros estudios que permiten hacer inferencias con bases más sólidas sobre el efecto y posible mecanismo de acción para esta serie de compuestos, pero es necesario evaluar el efecto de los compuestos, en sistemas bajo condiciones fisiológicas similares en las que se encuentran los pacientes con diabetes tipo 2.

### **8.3 Actividad hipoglucemiante en ratones CD1 diabéticos por inducción con aloxano.**

La evaluación de las tres actividades; anti hiperglucémica, inhibición de la absorción e hipoglucemiante, dieron pauta para seleccionar a los compuestos más prometedores: Cas III Ha, Cas III La, Cas VI gly y Cas VIII gly (Tabla 13) y evaluarlos en un modelo donde la integridad del páncreas se encuentre comprometida, para determinar y cuantificar su efecto antidiabético. En este modelo, igual que en la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina es la característica clave y se manifiesta como la señalización atenuada del receptor de insulina (IR) en respuesta a los mismos niveles de unión a la insulina y/o a una disminución en la secreción de insulina. Esto se hizo evidente en el modelo con ratones diabéticos, donde presentaron mayor resistencia a la administración i.v. de insulina que los ratones normoglucémicos, por lo que fue necesario evaluar una dosis mayor de insulina.

La cinética de los compuestos de coordinación y de la insulina ( $0.0396 \mu\text{mol/kg}$ ) muestran respuestas similares en este modelo, en donde, el ABC de Cas III Ha ( $9.090 \mu\text{mol/kg}$ ) y Cas VI gly ( $23.481 \mu\text{mol/kg}$ ) presentan un efecto cercano al observado con insulina ( $0.0792 \mu\text{mol/kg}$ ). A diferencia de lo esperado por la evaluación en los modelos pasados, para Cas VIII gly, Cas III La y Cas II gly se observó una disminución del efecto, posiblemente se deba a la poca integridad de las células  $\beta$  pancreáticas o la baja disponibilidad de los IR para ejercer acción intrínseca; es posible que los compuestos ejerzan su efecto estimulando la utilización de glucosa, pero no la secreción de insulina. Granchi (2014) menciona que existe inhibición de la HK promovida tanto por Cas II gly y metformina, a saber que esta biguanida, estimula

la activación de la traslocación de los GLUT en el músculo para mejorar la captación de glucosa, y en hígado promueven la disminución de la lipogénesis y gluconeogénesis como resultado de la inhibición de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria<sup>105,106</sup>, este último efecto sobre la actividad mitocondrial ha sido reportado para alguno de los compuestos.

Se ha reportado que las mitocondrias aisladas de corazones tratados con Cas III Ea, Cas II gly y Cas III ia ( $IC_{50} = 1.3 \pm 0.2$ ;  $5.5 \pm 0.5$ ;  $10.0 \pm 0.7 \mu M$ ) mostraron pérdida significativa del potencial de membrana (despolarización) y una reducción de la capacidad de retención mitocondrial de  $Ca^{2+}$  por apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), además, con estímulo de calcio de entre 40 - 80  $\mu M$ . En estos tratamientos no se observaron producción significativa de ROS<sup>87,107-111</sup>. Estos resultados coinciden con los reportado por Jáuregui (2019), en donde el estudio de redes cruzadas (PXN) (Figura 9) en células HeLa expuestas a Cas II gly (40  $\mu M$ ), muestra activadas las vías de señalización de calcio.

Partiendo de este hecho, se propone que la administración de los compuestos *in vivo* induce una acumulación en cantidades de calcio necesarias para llevar a la despolarización de las células  $\beta$  pancreáticas, aumentando la  $[(Ca^{2+})_i]$  que provoca la activación de la sinaptotagmina de las vesículas secretoras de insulina y activando la vía de señalización de insulina. La propuesta es consistente con los estudios realizados por Espinal (2016), en donde se encontró sobre expresada la señalización del fosfoinositol-3-quinasa clase I y la transducción de señales del receptor de insulina<sup>89</sup>, sugiriendo que de alguna manera la regulación sistémica de glucosa por parte de las Casiopeínas puede deberse a la estimulación o activación de las vías de señalización de la insulina. Específicamente el primero, es un componente importante en la cascada de señalización de la insulina, interactuando como sustrato del IR con el fin de regular la entrada de glucosa a la célula mediante una serie de eventos de fosforilación de este receptor. Además, de la activación del Akt, cinasa que se encarga de coordinar la traslocación del transportador 4 de glucosa (GLUT4) a la membrana plasmática a través de la remodelación de la actina<sup>31,32,33</sup>.

Por otro lado, en un estudio publicado por Trejo (2005), en ratas Wistar, macho con tumor inducido por células de glioma C6 y tratados con Cas II gly a 0.4 y 0.8 mg/kg por 21 días se

encontró una reducción estadísticamente significativa de glucosa de un 57.11 y 56.64%, respectivamente. Esta disminución de glucosa en modelos tumorales coincide con lo observado en nuestros sistemas normogluceémicos y en la disminución de glucosa circulante en los modelos diabéticos. Considerando que la administración en células tumorales sobreexpresa vías asociadas con los IR y que se observa una disminución muy importante de la glucosa tras la administración de las Casiopeínas, es posible proponer que en los modelos no tumorales las Casiopeínas también estén sobreexpresando vías asociadas con los receptores de insulina que tienen como consecuencia la disminución de los niveles de glucosa circulante.

## 9.0 CONCLUSIONES

Las Casiopeínas poseen efecto anti hiperglucémico, similar al que presenta la empagliflozina, muy probablemente por inhibición de las enzimas  $\alpha$  glucosidasas y/o inhibiendo el transporte intestinal de glucosa por bloqueo del SGLT. Así mismo, presentaron efecto sobre la regulación sistémica de la glucosa, con un efecto hipoglucemiante en ratones normoglucémicos semejante al presentado por insulina e inclusive mejor que glibenclamida. Aunque el efecto es diferente entre el modelo normoglucémico y diabético, se cree que este efecto se debe presuntamente por estimular un aumento en las concentraciones de calcio, activando la vía de señalización de la insulina.

No se conoce el mecanismo de acción a nivel molecular por el que están ejerciendo su efecto, sin embargo, existen antecedentes indirectos que respaldan la propuesta de estos compuestos como futuros tratamientos en la diabetes. Una de las diferencias más evidentes en la evaluación en modelos diabéticos es que ninguno de los compuestos mostró picos hipoglucémicos en comparación con la respuesta de insulina. Esto ofrece ventajas sobre los tratamientos hipoglucemiantes, abriendo la posibilidad de usar los compuestos que han resultado más activos en tratamientos crónicos reduciendo la concentración administrada.

En conjunto todos los datos demuestran que las Casiopeínas poseen efecto antidiabético en las diferentes evaluaciones. Adicionalmente, se observó que su efecto sobre la regulación de la glucosa es en un rango de dosis bajas de 0.9 a 18.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , respecto a las concentraciones necesarias para generar toxicidad de 16.0 a 51.  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , proporcionando una ventana de seguridad amplia, por tanto, podrían ser candidatos ideales como nuevos tratamientos para la diabetes mellitus.

## PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de los compuestos de coordinación como inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas en modelos *in vitro* mediante espectrofotometría.
- Determinar el mecanismo de acción a través del cual las Casiopeínas ejercen sus efectos hipoglucemiantes.
- Evaluar la toxicidad aguda y subaguda de las Casiopeínas más activas para determinar si pueden administrarse en tratamientos crónicos.
- Evaluar el efecto de las Casiopeínas *in vitro* en cultivos primarios de páncreas e hígado para determinar su efecto citotóxico, y cuantificar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el marcador fluorescente Fura-2, para determinar si existe alguna relación entre la concentración de calcio y su efecto hipoglucemiante.
- Evaluar el efecto de los compuestos sobre el metabolismo energético en cultivo primario de hígado y en co-cultivo primario de hígado/páncreas bajo diferentes estímulos donde no se encuentre comprometido la integridad celular.
- Cuantificar las concentraciones de insulina endógena presente en los cultivos primarios de páncreas después del estímulo con las Casiopeínas.

## REFERENCIAS

1. Association AD. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2019. 42:208.
2. Federación Internacional de la Diabetes. Atlas de la Diabetes de la FID. Novena edición. Bruselas, Bélgica. 2019.
3. Beejmohun V, Peytavy IM, Mignon C, *et al.* Acute effect of Ceylon cinnamon extract on postprandial glycemia: alpha-amylase inhibition, starch tolerance test in rats, and randomized crossover clinical trial in healthy volunteers. *Complementary and Alternative Medicine*. 2014.14:351-362.
4. American Diabetes Association. Diabetes Mellitus: clasificación y diagnóstico. *Diabetes Care*. 2010. 33 (1):62-69.
5. Moreno JM. Diabetes mellitus tipo 1 en niños y adolescentes. *Nutrición Hospitalaria*. 2010. 1;14-22.
6. González SE, Pascual CI, Laclaustra G. Síndrome metabólico y diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*.2005. 5: 30-37.
7. González LA, Pieper L, Mengel S. Evaluation of glucosa dose on intravenous glucosa tolerance test traits in Holstein Friesian heifers. *Journal of Dairy Science*. 2018. 101(1): 774-782.
8. International Diabetes Foundation. Chapter 1: What is diabetes. Septima edición. Bruselas, Bélgica. 2017; 17-25.
9. Velazco BJ, Brena VM. Diabetes Mellitus tipo 2: epidemiología y emergencia en salud. *Salud y Administración*. 2014. 1(2); 11-16.
10. Hernández AM, Gutiérrez J, Reynoso NN. Diabetes mellitus en México: el estado de epidemia. *Salud Publica de México*.2013. 55 (1); 129-558.
11. Hall J, Guyton A. Tratado de fisiología Medica: Insulina, glucagón y diabetes mellitus. 2008, Barcelona: Elsevier. Cap 78; pp. 939-954.
12. King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *Journal of Periodontol*.2008. 78 (8s); 1527-1534.
13. Zhuo F, Dongmin L. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Rev Curr Diabetes*. 2013. 9(1); 25-53.
14. Reyes FA, Pérez ML, Alfonso E, *et al.* Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo científico médico*. 2006. 20 (1); 98-121.
15. Keenan JM, June Z, Martin RJ. *Et al.* Role of resistant starch in improving gut health, adiposity, and insulin resistance. *American Society for Nutrition*. 2015. 6;198-205.
16. Carrasco F, Galgani JE, Reyes M. Síndrome de resistencia a la insulina: estudio y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2013. 24(5); 827-837.
17. Mora O, Pérez A, Sánchez R, *et al.* Morbilidad oculta de prediabetes y diabetes mellitus tipo 2 en pacientes con sobrepeso y obesidad. *Medisan*. 2013. 17(10); 6095 – 7001.

18. Mendivil CO, Sierra ID. Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Revista Médica Universitaria Nac Colombia*. 2005. 53 (4); 235-244.
19. Menéndez TE, Lafita TJ, Artola MS, *et al.* Recommendations for the pharmacologic treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Revista de Nefrología*. 2011. 31(1); 17-36.
20. García GC. Diabetes mellitus gestacional. *Medicina Interna de México*. 2008. 24(2); 148-156.
21. Medina E, Sánchez A, Hernández A, *et al.* Diabetes gestacional: diagnóstico y tratamiento en el primer nivel de atención. *Medicina Interna de México*. 2017. 33(1); 91-98.
22. Lontchi YE, Sobnwi E, Matsha TE, *et al.* Diabetes mellitus e inflamación. *Current Diabetes Reports*. 2013. 13(3); 435-444.
23. Morris C, Grada C, Ryan M, *et al.* Identification of differential responses to and oral glucose tolerance test in healthy adults. *Plos One*. 2013. 8(8); 1-9.
24. Castrejón V, Carbó R, Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de glucosa. *Revista de Educación bioquímica*. 2007. 26(2); 49-51.
25. López GP, Albarrán OG, Megías MC. Inhibidores del cotransporte sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2): de la glucosuria renal familiar al tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de Nefrología*. 2010. 30(60); 618-625.
26. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *Journal of Internal Medicine*. 2007. 261;32-43.
27. Sandoval M, Vargas B, Flores L, *Et al.* Glucotransportadores (GLUT); aspectos clínicos, moleculares y genéticos. *Gaceta Médica de México*. 2016. 152; 547-557.
28. Bruton L, Chabner B, Knollmann B. Bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw Hill Interamericana, 2012. Powers CA, D'Alessio D. (Cap 43). Páncreas endocrino y farmacoterapia de la diabetes mellitus e hipoglucemia. Pag 1237 – 1273.
29. Arechavaleta GR. El efecto fisiológico de las hormonas incretinas. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine*. 2006. 6(7<sup>a</sup>); 581-585.
30. Rosak C, Mertes G. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2012. 5;357-363.
31. Sim L, Quezada R, Sterchi E, *et al.* Human intestinal maltase-glucoamylase: cristal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of Molecular Biology*. 2008. 375(3); 782-792.
32. Tsujita T, Persimmon T. Amylase inhibitor, retards carbohydrate absorption in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2016. 62(3); 192-197.
33. Margaret E, Smith DS, Dion G. The digestive system. *Churchill Livingstone*, 2010. Pp. 228.

34. Brás N, Santos M, Fernandez P, *et al.* Mechanistic pathway on human  $\alpha$ -glucosidase maltase-glucomylase unveiled by QM/MM calculations. *The Journal of Physical Chemistry*. 2018. 122 (14); 3889-3899.
35. Xu J, Yuan H, Ran T, *et al.* A selectivity study of sodium dependent glucose cotransporter 2 / sodium dependent glucose cotransporter 1 inhibitors by molecular modeling. *Journal of Molecular Recognition*. 2015. 28; 467-479.
36. Hamilton K, Butt A. Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. *American Journal of Physiology Advances in Physiology Education*. 2013. 37(4); 415-426.
37. Arraiz N, Leal E, Linares S, *et al.* Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Farmacología y Terapéutica*. 2007. 26(2); 76-86.
38. Díaz H, Burgos H. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *Revista Iatreia*. 2002. 15(3); 179-189.
39. Laserna M. El páncreas endocrino. *Asociación Castellano Manchega de Análisis Clínicos*. 2014. 227-248.
40. Zhang T, Dong H. Glucose regulated insulin production in the liver improves glycemic control in type 1 diabetic mice. *Molecular Metabolism*. 2015. 4(1); 70-76.
41. Llanos P, Contreras F, Barrientos G, *et al.* Glucose dependent insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cell islets from male rats requires  $\text{Ca}^{2+}$  release via ROS-stimulated ryanodine receptors. *Journal Plos One*. 2015. 10(6); 1-24.
42. Seino S. Cell signalling in insulin secretion: the molecular targets of ATP, cAMP, and sulfonylurea. *Diabetology*. 2012. 55(8); 2096-2108.
43. Li Q, Lei Y, Kang C. Biochimica et biophysica acta solution structure of the transmembrane domain of the insulin receptor in detergent micelles. *Journal BBA Biomembranes*. 2014. 1838(5); 1313-1321.
44. Olivares J, Arellano A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Endocrinología Molecular*. 2008. 27(1); 9 – 18.
45. Cruz H, Licea P, Hernández G, *et al.* Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2011. 58(2); 102 – 107.
46. Chung S. Contribution of polyol pathway to diabetes induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2013. 14 (3);233-236.
47. Degenhardt T, Thorpe J. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cellular and Molecular Biology*. 1998. 44(7); 1139-1145.
48. Marshall S, Bacote V, Traxinger R. Discovery of metabolic pathway mediating glucose induced desensitization of the glucose transport system: role of hexosamine in the induction of insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 1991. 266(8); 4706-4712.

49. Marquez V, Schmid R, Bochud M, *et al.* Adipocytokines, hepatic and inflammatory biomarkers and incidence of type 2 diabetes, the coLaus study. *Plos One*. 2012. 7(12); 1-12.
50. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001. 414; 813-820.
51. Díaz F, Baiza G, Ibáñez H, *et al.* Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Medica Mexicana*. 2004. 140(4);437-447.
52. Hoyer D, Korkmaz Y, Grönke S, *et al.*, Differential expression of protein kinase C isoforms in coronary arteries of diabetic mice lacking the G-protein Ga11. *Cardiovasc Diabetol*. 2010. 9(1):93.
53. Xia P, Kramer R, King G. Identification of the mechanism for the inhibition of Na<sup>+</sup> , K<sup>+</sup> - adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *Journal of Clinical Investigation*. 1995. 96; 733-740.
54. Carvajal C. Productos finales de glicación (AGEs) y la nefropatía diabética. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2015. 32(1);1-7.
55. Misur I, Zarković K, Barada A, *et al.*, Advanced glycation end products in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy. *Acta Diabetol*. 2004. 41(4):158-166.
56. American Diabetes Association. Role of cardiovascular risk factors in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care*. 1991. 12(8);69-75.
57. Serna, L, Pineda, N, García A, *et al.*, Nefropatía diabética. *Medicina UPB*. 2009. 28(1):42-53.
58. Alfaro J, Quílez P, Martínez B. Complicaciones hiperglucémicas agudas de la diabetes mellitus: cetoacidosis diabética y estado hiperosmolar hiperglucémico. *Medicine*. 2012. 11(18):1061-1067.
59. Fowler M. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008. 26(2):77-82.
60. Triana E. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Revista Cuba de Angiología y Cirugía Vascular*. 2001. 2(2):131-141.
61. Dube A. Diabetic retinopathy. *Journal of medicine*. 1963. 63(10); 2783-2786.
62. Martínez C, Paredes F, Zacarías C, *et al.* Neuropatía diabética. *Revista Hospital General Dr. M Gea González*. 2002. 5(1); 7-23.
63. Valdés E, Bencosme N. Las complicaciones macrovasculares y su relación con algunas variables clínicas y bioquímicas en diabéticos tipo 2. *Revista Cuba de Endocrinología*. 2010. 21(3);256-268.
64. Sociedad Mexicana de endocrinología y nutrición. Complicaciones macrovasculares en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de endocrinología y nutrición*. 2004. 12(2); 23-30.

65. Katzung B. Farmacología básica y clínica. Mc Graw Hill. 2018. México. Nolte MS, Masharani U (Cap. 44). Hormonas pancreáticas y fármacos antidiabéticos. Pag 747 – 771.
66. Flórez J. Farmacología humana. Masson Salvat Medicina. 2001. México.
67. Kathryn L, Franz K. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chemistry Rev.* 2009. 109(10); 4921-4960.
68. House J. Inorganic Chemistry. Academic Press. San Diego, 2013. Cap 16. Introduction to coordination chemistry. 2013;553-590.
69. Niu X, Yang J, Yang X. Synthesis, and anti-diabetic activity of new N, N-dimethylphenylenediamine derivatized nitrilotriacetic acid vanady complex. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2017. 177; 291-299.
70. Tsave O, Yavropoulou MP, Kafantari M, *et al.*. Comparative assessment of metal-specific adipogenic activity in zinc and vanadium-citrates through associated gene expression. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2018. 186; 217-227.
71. Ros M, Medina G. Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición.* 2011. 58(7);360-369.
72. Conconi M, Decarlo E, Vigolo S, *et al.* Effects of Some Vanadyl Coordination Compounds on the In Vitro Insulin Release from Rat Pancreatic Islets. *Hormone and Metabolic Research.* 2003. 35; 402-406.
73. Elizabeth J, Shahid M, Kurup M. Biology Metal based biologically active compounds : Design , synthesis , DNA binding and antidiabetic activity of 6-methyl-3-formyl chromone derived hydrazones and their metal ( II ) complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 2017.175; 78-191.
74. Nishiguchi T, Yoshikawa Y, Yasui H. Anti-Diabetic Effect of Organo-Chalcogen ( Sulfur and Selenium ) Zinc Complexes with Hydroxy-Pyrone Derivatives on Leptin-Deficient Type 2 Diabetes Model ob / ob Mice. 2017. 18; 2647-2663.
75. Nishiguchi T, Yoshikawa Y, Yasui H. Investigating the target organs of novel anti-diabetic zinc complexes with organo - selenium ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2018. 185; 103-112.
76. Kovalska V, Chernii V. Activity of Zn and Mg phthalocyanines and porphyrazines in amyloid aggregation of insulin. *Journal of Molecular Recognition.* 2018. 31;1-7.
77. Gong G, Du W, Xu J, *et al.*. Regulation of heteronuclear Pt – Ru complexes on the fibril formation and cytotoxicity of human islet amyloid polypeptide. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2018. 189; 7-16.
78. Zhu M, Zhou J, Jin Y, *et al.* International Journal of Biological Macromolecules A manganese-salen complex as dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *International Journal of Biological Macromolecules* . 2018. 120;1232-1239.
79. Vizcaya A, Rivero A, Ruiz L, *et al.*. Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: Casiopeina II. *Toxicology.* 2003. 194(1-2):103-113.

80. Rodríguez J, Florín D, Álvarez L, *et al.* In vitro DNA damage by Casiopeina II-gly in human blood cells. *Drug and chemical toxicology*. 2016. 545; 7-15.
81. Leal M, Sumano H, García L, *et al.* Caracterización y tratamiento de los efectos tóxicos agudos de las casiopeínas III ia y II gly. *Congreso Nacional de Química Médica*. 2006. 7(2); 1-7.
82. Bravo E, García J, Gracia I, Ruiz L. Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeínas®). *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009. 103(2); 299-309.
83. Becco L, Rodríguez A, Bravo ME, *et al.* New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012. 109;49-56.
84. Vizcaya A, Rivero A, Ruiz L, *et al.* Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*. 2000.14(1);1-5.
85. Bravo E, Campero C, García D, *et al.*, DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas®) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron*. 2015. 102;530-538.
86. Kachadourian R, Brechbuhl M, Ruiz L, *et al.*, Casiopeína IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*. 2010. 268(3);176-183.
87. Carvallo F, Trejo C, Gómez R, *et al.* Casiopeina III ia induces apoptosis in HCT-15 cells *in vitro* through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect *in vivo*. *Biometals*. 2008. 21;17-28.
88. Marín H, Gallardo P, Ramírez Y, *et al.*, Casiopeina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase , glycolysis , and oxidative phosphorylation. *Archives Toxicology*. 2012. 86; 753-766.
89. Espinal J, Hernández E, Mejía C, *et al.*, Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. *Frontiers in Physiology*. 2016. 6; 1-13.
90. Espinal J, Hernández E, Mejía C, *et al.* Network analysis shows novel molecular mechanisms of action for copper-based chemotherapy. *Frontiers in Physiology*. 2016. 6; 1-13.
91. Jáuregui G, Espinal J, Hur J, *et al.* Identification of Casiopeina II-gly secondary targets through a systems pharmacology approach. *Computational Bioogy and Chemistry*. 2019. 78; 127-132.
92. García R, Vértiz G, Macías L, *et al.* Isomeric Effect on the Pharmacokinetic Behavior of Anticancer CuII Mixed Chelate Complexes: Experimental and Theoretical Approach. *Eurupean Journal of Inorganic Chemistry*. 2017. 12; 1728-1736.

93. Rufino Y, Ponce M, García R, *et al.* Antigiardiasic activity of Cu ( II ) coordination compounds : Redox imbalance and membrane damage after a short exposure time. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2019. 195; 83-90.
94. Cañas-Alonso RC, Fuentes-Noriega I, Ruiz-Azuara L. Pharmacokinetics of Casiopeína IIgly in beagle dog: A copper based compound with antineoplastic activity. *J Bioanal Biomed.* 2010;2(2):28-34.
95. Lee Y, Kang J, Choe E, Kim JI. Hypoglycemic and antioxidant effects of Daraesoon (Actinidia arguta shoot) in animal models of diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice.* 2015. 9(3); 262-267.
96. Park E, Lee H, Han S. Sargassum yezeoense extract inhibits carbohydrate digestive enzymes in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Preventive Nutrition and Food Science.* 2017. 22(3);166-171.
97. Aguilar L, Ramírez G, Nicasio P, *et al.* Antidiabetic activities of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology.* 2009. 124(2);284-288.
98. Borges E, Silveira A, Carvalho I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron.* 2006. 62(44);10277-10302.
99. Ryu W, Cho K, Curtis J, *et al.*  $\alpha$ -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthenes from Garcinia mangostana. *Phytochemistry.* 2011. 72(17);2148-2154.
100. Nabi S, Kasetti R, Sirasanagandla S, *et al.* Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of Piper longum root aqueous extract in STZ induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13(1):1.
101. Matsuura H, Asakawa C, Kurimoto M, Mizutani J.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (momordica charantia) and the fruit bodies of griFOL frondosa. *Bioscience Biotechnology Biochemistry.* 2002. 66(7);1576-1578.
102. Santer R, Calado J. Familial Renal Glucosuria and SGLT2: from a medelian trait to a therapeutic target. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2010. 5;133 – 141.
103. Martin C, Mayoux E, Vallon V. A comprehensive review of the pharmacodynamics of the SGLT2 inhibitor empagliflozin in animals and humans. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology.* 2015. 388(8); 801-816.
104. Press D. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. 2014. 8; 1335 – 1380.
105. Granchi C, Fancelli D, Minutolo F. Letters An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 2014. 24(21); 4915-4925.
106. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017. 60; 1577-1585.
107. Silva C, Guerrero E, Carrancá M, *et al.* Antineoplastic copper coordinated complexes ( Casiopeinas ) uncouple oxidative phosphorylation and induce mitochondrial

- permeability transition in cardiac mitochondria and cardiomyocytes. 2016:43-54. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2016. 48; 43 – 54.
108. Silva C, Villegas C, Oropeza Y, *et al.* Ex Vivo Cardiotoxicity of Antineoplastic Casiopeinas Is Mediated through Energetic Dysfunction and Triggered Mitochondrial-Dependent Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018. 2018;1 – 13.
109. Trejo C, Palencia G, Zuñiga S, *et al.* Cas Ilgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Neoplasia*. 2005. 7(6); 563-574.
110. Herna L, Mari A, Carvajal K, Moreno-sa R. Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2006. 212; 79-88.
111. Chavez A, Centeno S, Moreno D, *et al.* Casiopeina III-Ea , a copper-containing small molecule , inhibits the in vitro growth of primitive hematopoietic cells from chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2017. 52; 8-19.
112. Fuentes NI. Farmacocinética preclínica de Casiopeína III ia y su unión a proteínas plasmáticas. Tesis de Doctorado. UNAM,2005.

Cuernavaca, Mor., 02 de marzo de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina


Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación de la actividad antihiper glucémica e hipoglucemiante de compuestos coordinados de cobre (casiopeínas) en modelos experimentales**", que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Victoria Vera Pineda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**



**M. en C. José Santos Angeles Chimal**

Cuernavaca, Mor., 02 de marzo de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**  
Directora  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Evaluación de la actividad antihiper glucémica e hipoglucemiante de compuestos coordinados de cobre (casiopeínas) en modelos experimentales”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Victoria Vera Pineda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**



**Dra. Gabriela Castañeda Corral**

Cuernavaca, Mor., 02 de marzo de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Evaluación de la actividad antihiper glucémica e hipoglucemiante de compuestos coordinados de cobre (casiopeínas) en modelos experimentales”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Victoria Vera Pineda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**



**Dra. Yanis Toledano Magaña**

Cuernavaca, Mor., 02 de marzo de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación de la actividad antihiper glucémica e hipoglucemiante de compuestos coordinados de cobre (casiopeínas) en modelos experimentales**”, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Victoria Vera Pineda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**



**Dr. Juan Carlos García Ramos**



Cuernavaca, Mor., 02 de marzo de 2020.

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Directora

Facultad de Medicina


Presente:

Estimada Dra. Petricevich, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis **“Evaluación de la actividad antihiper glucémica e hipoglucemiante de compuestos coordinados de cobre (casiopeínas) en modelos experimentales”**, que para obtener el grado de Maestra en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Victoria Vera Pineda. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**



**Dr. Juan José Acevedo Fernández**