



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa



**ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE, ANTIOXIDANTE Y  
ANTIINFLAMATORIA DE *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Ibervillea  
sonorae* Greene Y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass., PLANTAS  
USADAS EN EL CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**PRESENTA**

**M. en B. E. TANIA ROSARIO BANDERAS DORANTES**

**COMITÉ TUTORAL**

**Co- Directores**

**Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

**Dra. Rebeca García Macedo**

**Asesores**

**Dr. Rubén Román Ramos**

**Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez**

**MÉXICO, D.F. Diciembre, 2012.**

# COMITÉ TUTORAL

***Co-Director Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar***

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Co- Directora Dra. Rebeca García Macedo**

Investigadora

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

**Asesor Dr. Rubén Román Ramos**

Profesor titular C

Laboratorio de Farmacología

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Asesor Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez**

Investigador

Centro de Investigación Biomédica del Sur

Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.

Parte de este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación Biomédica del Sur, Xochitepec Morelos, Cuernavaca; bajo la asesoría del Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez.

Otra parte de esta investigación, fue realizada en el laboratorio de Farmacología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa; bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y la asesoría del Dr. Rubén Román Ramos.

La parte final, fue realizada en la UIM en Bioquímica, Hospital de Especialidades CMN, Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Rebeca García Macedo.

El doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa pertenece al Padrón de de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP 20-93.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada con número de registro (CVU/becario) 185595/6794 y a las Fundaciones IMSS y Gonzalo Río Arronte.

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este proceso he recibido el apoyo de muchas personas, pero quisiera agradecerles en primer lugar a los Doctores Rubén Román y Francisco Alarcón, ya que sin ellos no hubiera logrado culminar esta etapa de mi vida académica.

A la Doctora Rebeca García, no solamente por haber fungido como mi directora, le doy las gracias porque en algunas ocasiones también escuchó mis problemas personales y recibí su ayuda.

Al Doctor Alejandro Zamilpa, por la paciencia que tuvo conmigo cuando estuve trabajando con él.

A los increíbles integrantes del laboratorio de Farmacología: Angeles, Selene, Gaby, Jessica, Anita, Ana L., Gerado B., Julio, Gerardo, Vladimir, René e Ivan.

Especialmente a mis amigas Vero y Jaki que han sido mis confidentes y consejeras en estos días tan tristes y complicados para mi.

A mis amigos del CIBIS: Pili, Alex, Deya, Maribel, Memo, Galia, Carol, Lolita, Irais, Indira, Carmen, Dante y Rodo.

A mi querida Conchita y a mi hermanita del alma Ade.

A mis maravillosos primos, Stephany y Víctor.

A mi más entusiasta ayudante, mi hermanita Fany.

A mi hermoso sobrino Haziél, por sus repetidos “Te amo”, que me hacen tanto bien.

A mi gran ausente que me hace tanta falta, Amalia.

Y a tí, Marcos por saber dibujar una sonrisa en mi rostro.

Y sobretodo a la mujer que le debo mi ser.

Los miembros del jurado designados por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE, ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA DE *Cucurbita ficifolia* Bouché, *Ibervillea sonorae* Greene Y *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass., PLANTAS USADAS EN EL CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS".

JURADO DE EXAMEN



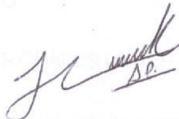
Presidente  
Dr. Rubén Román Ramos  
Departamento de Ciencias de la Salud  
- (UAMI)



Secretaria  
Dra. Rebeca García Macedo  
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica  
Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS)



Vocal  
Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez  
Centro de Investigación Biomédica del Sur  
(CIBIS-IMSS) Xochitepec, Morelos.



Vocal  
Dr. Julio César Almanza Pérez  
Departamento de Ciencias de la Salud  
(UAMI)



Vocal  
Dra. Elizabeth Hernández Pérez  
Departamento de Ciencias de la Salud  
(UAMI)

**1. INTRODUCCIÓN** **13**

1.1 DEFINICIÓN DE DIABETES MELLITUS	13
1.1.1 SIGNOS Y SÍNTOMAS	13
1.1.2 CLASIFICACIÓN	14
A) DM TIPO 1 (DM1)	14
B) DM TIPO 2 (DM2)	14
I) PREVALENCIA DE DM2	15
C) DM GESTACIONAL	15
D) OTROS TIPOS ESPECÍFICOS	15
1.1.2 FACTORES DE RIESGO	16
<b>1.2 CITOCINAS</b>	<b>16</b>
A) IL-6	17
C) RESISTINA	18
D) TNF- A	18
<b>1.3 RADICALES LIBRES</b>	<b>19</b>
1.3.1 ESTRÉS OXIDANTE	20
1.3.2 ESTRÉS OXIDANTE Y DM2	20
<b>1.4 METABOLISMO Y DM2</b>	<b>21</b>
1.4.1 METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS	22
A) GLUCÓLISIS	24
i) Lactato deshidrogenasa	25
B) GLUCONEOGÉNESIS	26
i) Glucosa 6-fosfatasa	27
C) FOSFATOS DE PENTOSAS	27
i) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	29
1.6.1 Dieta	29
1.6.2 Ejercicio	30
<b>1.6.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO</b>	<b>30</b>
1.6.3.1 INSULINA	30
1.6.3.2 AGENTES HIPOGLUCEMIANTES ORALES (AHO)	31
1.6.3.2.1 Biguanidas	31
a) Eficacia y uso clínico	31
b) Efectos secundarios y contraindicaciones	32
c) Mecanismo de acción	32
1.6.3.2.2 Inhibidores de alfa glucosidasas	32
a) Eficacia y uso clínico	33
b) Efectos secundarios y contraindicaciones	33
c) Mecanismo de acción	33
1.6.3.2.3 Derivados de las tiazolidinedionas	33
a) Eficacia y Uso clínico	34

b) Efectos secundarios y contraindicaciones	34
c) Mecanismo de acción	34
1.6.3.2.4 Incretinas	34
a) Eficacia y uso clínico	34
b) Efectos secundarios y contraindicaciones	34
c) Mecanismo de acción	35
1.6.3.2.5 Sulfonilureas	35
a) Eficacia y uso clínico	35
b) Efectos secundarios y contraindicaciones	36
c) Mecanismo de acción	36
1.6.3.2.5.1 Canales $K_{ATP}$	36
a) Estructura	36
b) Localización y función fisiológica	36
1.7 Acción del diazóxido	38
1.8 Acción de la fenilefrina y activación de los receptores $\alpha$ -adrenérgicos	38
1.9 Plantas medicinales	39
1.9.1 Cucurbita ficifolia	40
a) Descripción botánica	40
b) Distribución geográfica	40
c) Componentes químicos	40
d) Uso medicinal	41
1.9.2 Ibervillea sonora	41
a) Descripción botánica	41
b) Distribución geográfica	41
c) Componentes químicos	41
d) Uso medicinal	42
1.9.3 Psacalium peltatum	42
a) Descripción botánica	42
b) Distribución geográfica	43
c) Componentes químicos	43
d) Uso medicinal	44
<b>1.10 Estreptozotocina</b>	<b>44</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>46</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>47</b>
3.1.1 OBJETIVOS PARTICULARES	47
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>48</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
<b>5.1 MATERIAL VEGETAL</b>	<b>49</b>
5.1.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	49

5.1.2 ESTANDARIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS	50
a) <i>Cucurbita ficifolia</i>	50
b) <i>Ibervillea sonora</i>	51
c) <i>Psacalium peltatum</i>	52
5.1.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	53
5.1.3.1 Animales de experimentación	53
5.1.3.2 Efecto de <i>C. ficifolia</i> , <i>I. sonora</i> y <i>P. peltatum</i> en la concentración de glucosa, insulina, triglicéridos y citocinas	54
5.1.3.3 Evaluación del potencial bloqueador de los extractos sobre los canales $K_{ATP}$	54
5.1.3.4 Estimación de la actividad de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos	55
a) Lactato deshidrogenasa	55
b) Glucosa 6-fosfatasa	55
c) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	55
5.1.3.5 Efecto de los extractos sobre el contenido de glutatión reducido y malondialdehído	56
a) Determinación de glutatión reducido (GSH)	56
b) Determinación de malondialdehído (MDA)	56
<b>6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>57</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>58</b>
<b>7.1 ESTANDARIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS</b>	<b>58</b>
A) <i>CUCURBITA FICIFOLIA</i>	58
B) <i>IBERVILLEA SONORAE</i>	58
C) <i>PSACALIUM PELTATUM</i>	60
7.2 EFECTO DE <i>C. FICIFOLIA</i> , <i>I. SONORAE</i> Y <i>P. PELTATUM</i> SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA, INSULINA, TRIGLICÉRIDOS Y CITOCINAS	62
7.3 EFECTO DE LOS EXTRACTOS HIPOGLUCÉMICOS SOBRE EL POTENCIAL BLOQUEADOR DE LOS CANALES $K_{ATP}$	66
7.4 EFECTO DE LOS EXTRACTOS HIPOGLUCÉMICOS DE <i>C. FICIFOLIA</i> , <i>I. SONORAE</i> Y <i>P. PELTATUM</i> SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS LACTATO DESHIDROGENASA (LDH), GLUCOSA-6-FOSFATASA (G6FASA) Y GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6FD)	68
7.5 EFECTO DE LOS EXTRACTOS EN EL CONTENIDO DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) Y MALONDIALDEHÍDO (MDA)	71
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>74</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>80</b>

## RESUMEN

Una de las fuentes más antiguas del origen de medicamentos, indiscutiblemente, han sido las especies vegetales. En México se usan plantas, como fuentes antiguas y modernas, para el control o tratamiento de diversas enfermedades. Además, han sido utilizadas durante siglos por distintos grupos étnicos y representan la principal fuente de fármacos a partir de productos naturales. En particular, la herbolaria mexicana representa un recurso viable para la búsqueda de nuevos medicamentos para el control de enfermedades crónico-degenerativas, tales como la diabetes mellitus. En la actualidad, las plantas medicinales continúan siendo importantes y aún existen varias de ellas cuya utilidad terapéutica no se ha evaluado ni fitoquímica ni farmacológicamente, desconociendo sus mecanismos de acción, este conocimiento garantizaría sus efectos benéficos y su seguridad para los consumidores.

La hiperglucemia es el principal actor en el desbalance del sistema antioxidante y enzimático, además de ser el promotor de la inflamación y cuando coexisten estas tres condiciones se promueve un ambiente propicio para la aparición de las complicaciones de la diabetes, por lo que es de vital importancia encontrar las vías necesarias para controlar y/o tratar estas alteraciones de manera conjunta.

Considerando la información anterior el objetivo de este trabajo fue “Determinar el mecanismo de acción hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae* y *Psacalium peltatum*, así como estudiar su actividad enzimática, antioxidante y antiinflamatoria”. Para validar correctamente el mecanismo de acción de los extractos acuosos fue necesario, en primer lugar investigar la naturaleza de los principales componentes químicos presentes, por lo que se realizaron diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía en columna abierta, cromatografía de placa y cromatografía líquida de alta resolución –HPLC-) para la elucidación y estandarización de los extractos vegetales. Los análisis demostraron la presencia de D-quiró inositol (D-QI) en el *C. ficifolia*, a diferentes concentraciones dependiendo del método de obtención del extracto; en *I. sonorae* se encontraron dos glucósidos tipo cucurbitacinas previamente descritos en la literatura y finalmente en *P. peltatum* se identificó únicamente mediante RMN <sup>13</sup>C la presencia de peltalosa y también un fructano, el cual fue cuantificado mediante HPLC.

Se demostró la acción hipoglucemiante e hipolipemiante de los tres extractos en ratones con diabetes experimental inducida con estreptozotocina a los cuales se les administraron los extractos acuosos, pioglitazona o SSI vía i.g. durante 30 días. Por otro lado, también éste trabajo mostró evidencia experimental suficiente que establece el efecto antiinflamatorio de las tres especies vegetales bajo estudio, al disminuir la concentración plasmática de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ -R1 y resistina) y aumentar la adiponectina, citocina antiinflamatoria, sin embargo falta establecer si en el mecanismo participa el receptor activado por proliferadores de

peroxisomas tipo gama (PPAR $\gamma$ ), como el observado con pioglitazona, por lo tanto son necesarios estudios adicionales que lo confirmen.

Este trabajo presenta por primera vez, evidencias acerca del efecto de los extractos acuosos de las tres plantas sobre las enzimas; lactato deshidrogenasa (glucolisis), glucosa 6-fosfatasa (gluconeogénesis y glucogenólisis) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (vía de los fosfatos de pentosas), las cuales juegan un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa. Estableciendo con ello un posible mecanismo de acción adicional a través del cual estos extractos ejercen su efecto hipoglucémico. Sugiriendo que, en parte, éste podría deberse a la disminución en la actividad de la G6Pasa y al incremento en la G6PD, sin embargo son necesarios estudios adicionales que indiquen el efecto de estos extractos sobre otras de las enzimas clave del metabolismo de los carbohidratos.

Los resultados aportan información en contra de que el incremento sobre la concentración de insulina con *C. ficifolia*, sea mediada a través de los canales K<sub>ATP</sub>, como fue reportado por Xia and Wang (2006b). En cambio los resultados sugieren que el efecto hipoglucémico de *I. sonorae* es mediado directamente a través de estos canales. Es necesario investigar si el bloqueo registrado sobre los canales de K<sub>ATP</sub> es a través de sus subunidades SUR o Kir, por lo que se requiere realizar experimentos directamente en islotes de células  $\beta$  pancreáticas en presencia del extracto de *I. sonorae*.

Por último, también éste trabajo dejó demostrado el efecto antioxidante que ejercen los extractos acuosos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* al ser administrados crónicamente a ratones con diabetes experimental, lo cual representaría para los pacientes diabéticos un beneficio adicional.

## ABSTRACT

One of the oldest sources about the origin of drugs, have been the plants. The plants have been used in Mexico as ancient and modern sources, for the control or treatment of various diseases. They also have been used for centuries by different ethnic groups and represent the main basis of drugs from natural products. In particular, Mexican herbalism is a viable resource for finding new drugs to control chronic-degenerative diseases, such as diabetes mellitus. Today, medicinal plants are still important and there are some of them, whose therapeutic usefulness has not been phytochemical or pharmacologically evaluated, or their mechanisms of action are ignored, this knowledge would ensure its benefits and safety for consumers.

Hyperglycemia is the main actor in the imbalance of antioxidant enzyme system, besides to be the promoter of inflammation and when these three conditions coexist, there is an environment that could conduce to the development of diabetes complications, so it is necessary to find ways to control and/or treat these disorders jointly.

Considering the previous information, the aim of this study was to "determine the mechanism of hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae* and *Psacalium peltatum*, and to study their enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities". To properly validate the mechanism of action of the aqueous extracts of the each plant, it was necessary first to investigate the nature of the main chemical components, then to elucidate and standarize the plant extracts we used various chromatographic techniques (open column chromatography, chromatography plate and high performance liquid chromatography -HPLC-). These analysis showed the presence of different concentrations of *D*-chiro-inositol (D-CI) in *C. ficifolia*, it was dependent of the method to prepare the extract. In *I. sonorae* were found two glycosides type cucurbitacins, previously described in the literature and finally in *P.peltatum* was identified peltalosa by <sup>13</sup>C NMR and also a fructan, which was quantified by HPLC.

It was demonstrated the hypoglycemic and hypolipidemic action of the three extracts in mice with experimental diabetes induced by streptozotocin, in which the aqueous extracts, pioglitazone or SSI were administered via ig for 30 days. Furthermore, this work also showed sufficient experimental evidence that established the antiinflammatory effect of three plant species under study, because in the same animals the aqueous extracts reduced the plasma concentration of pro-inflammatory markers (IL-6, TNF-R1 and resistin) and increased adiponectin, an antiinflammatory cytokine, however it is necessary to establish whether the PPAR $\gamma$  is involved in the mechanism, as with pioglitazone, therefore additional studies are needed to confirm this.

This paper presents for the first time, evidence about the effect of the aqueous extracts of the three plants, included in this study, on enzymes, lactate dehydrogenase (glycolysis), glucose-6-phosphatase (gluconeogenesis and glycogenolysis) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (phosphates pathway pentoses), which play a key role in glucose homeostasis. This results help to establish a possible additional mechanism of action through the aqueous extracts exert their hypoglycemic effect. Suggesting that, in part, this may be due to the decrease in the activity of

G6Pase and the increase of G6PD, but further studies are needed to indicate the effect of these extracts on other key enzymes of carbohydrate metabolism.

The results provide information against that the increase of insulin concentration with *C. ficifolia* is mediated via  $K_{ATP}$  channels reported by Xia and Wang (2006b). In contrast, the results suggest that the hypoglycemic effect of *I. sonorae* is mediated directly through these channels. It is necessary to investigate if blocking registered on  $K_{ATP}$  channels is through SUR or Kir subunits, therefore are required some additional experiments directly on pancreatic  $\beta$  islet cells in the presence of the extract of *I. Sonorae*.

Finally, this work also demonstrated the antioxidant effect of the aqueous extracts of *C. ficifolia*, *I. sonorae* and *P. peltatum* when were administered chronically to mice with experimental diabetes, which represent for diabetic patients an additional benefit.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Definición de diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad caracterizada por un estado de hiperglucemia crónica que se presenta junto con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, debido a la ausencia o disminución en la secreción y/o acción de la insulina. Los efectos de la DM a largo plazo incluyen disfunción y falla en varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. En el desarrollo de la DM están involucrados varios procesos patogénicos, lo cuales van desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina, hasta la generación de resistencia a insulina. La base de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas es la acción deficiente de la insulina en los tejidos blanco, resultado de la inadecuada secreción o disminución en la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o más puntos de las vías de acción de esta hormona. El deterioro en la secreción de insulina y los defectos en su acción frecuentemente coexisten en el mismo paciente, no siendo clara cuál es la primera causa de la hiperglucemia (Expert Committee, 2003a; 2003b).

#### 1.1.1 Signos y síntomas

La DM presenta síntomas característicos tales como: polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, visión borrosa, náuseas, vómito, debilidad, incremento en la susceptibilidad a infecciones (por ejemplo vaginitis), irritabilidad, apatía, impotencia (en hombres), los signos que llevan al diagnóstico de la diabetes son, altos niveles de glucosa en sangre y orina, cetoacidosis y coma (Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003 a y b).

Los efectos a largo plazo de la DM incluyen el desarrollo progresivo de complicaciones específicas; por ejemplo, las consecuencias vasculares de la diabetes consisten en anormalidades macrovasculares (macroangiopatía) y microvasculares (microangiopatía). Las anormalidades macrovasculares resultan en aterosclerosis con incremento en enfermedades cerebrovasculares e infarto del miocardio. Las afecciones neuropatológicas afectan al sistema autónomo y a los nervios periféricos y, junto con la insuficiencia circulatoria aterosclerótica en las extremidades, puede producir ulceración crónica y gangrena, en particular en los pies. Las anormalidades microvasculares comprenden cicatrización proliferativa de la retina (retinopatía diabética) y enfermedad renal (nefropatía diabética). Las complicaciones microvasculares se explican en gran parte por la hiperglucemia crónica y algunas veces pueden prevenirse controlando esta última. Sin embargo, es poco probable que el control glucémico ayude en el caso de las anormalidades macrovasculares. Los pacientes con DM tienen alta incidencia de enfermedades ateroscleróticas cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares; frecuentemente hipertensión, alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas y enfermedades dentales. El impacto social y emocional de la DM, así como la demanda de terapia efectiva, pueden provocar disfunción

psicosocial en los pacientes y sus familiares (Edelstein y col, 1997; Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, a y 2003 b).

### **1.1.2 Clasificación**

Se distinguen 4 tipos de DM: tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos específicos, entre los que se encuentran: defectos genéticos de las células  $\beta$ , defectos genéticos en la acción de la insulina y asociada a otros síndromes, tales como: Down, Klinefelter, Cushing y Turner (Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003 a y b).

#### **a) DM tipo 1 (DM1)**

Antes conocida como DM dependiente de insulina o diabetes juvenil. La DM1 implica destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, resultando en ausencia de insulina. Los marcadores de la destrucción inmune de las células  $\beta$  pancreáticas incluyen auto anticuerpos a insulina, descarboxilasa de ácido glutámico y fosfatasas de tirosina (IA-2 y IA-2 $\beta$ ). La enfermedad también tiene una fuerte asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad. El índice de este tipo de diabetes es realmente variable, presentándose principalmente en niños y en algunos adultos. Algunos pacientes, principalmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad. Otros, con una moderada hiperglucemia en ayuno que rápidamente cambia a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis, en presencia de alguna infección o de estrés. La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas tiene múltiples predisposiciones genéticas que también están relacionados con factores ambientales. Aunque los pacientes con DM1 son en su mayoría delgados, la presencia de obesidad es incompatible con el diagnóstico. Estos pacientes son propensos a otros desórdenes autoinmunes, tales como: enfermedad de Graves o Addison, tiroiditis de Hashimoto y anemia (Expert Committee, 2003 a y b).

#### **b) DM tipo 2 (DM2)**

Antes conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina o diabetes de adultos. La DM2 se caracteriza por obesidad y resistencia a la insulina con cierto grado de disfunción en las células  $\beta$  pancreáticas. Los pacientes que padecen este tipo de diabetes regularmente no requieren el uso de insulina en su tratamiento. Los pacientes que no son obesos, de acuerdo al criterio índice de masa corporal, tienen un alto porcentaje de grasa en la región abdominal de su cuerpo. La cetoacidosis raramente se presenta de manera espontánea en este tipo de diabetes pero se encuentra usualmente en asociación con otras enfermedades, como por ejemplo una infección. Esta forma de diabetes regularmente no se diagnostica rápido, ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en sus etapas tempranas no alerta al paciente con los síntomas clásicos de la DM. Los pacientes con DM2 presentan aún células  $\beta$  pancreáticas funcionales, sin embargo, la insulina secretada es insuficiente para compensar los niveles de glucosa sanguínea después de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos o grasas. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes se incrementa con la edad, obesidad y la ausencia de actividad física. Está

frecuentemente asociada con una fuerte predisposición genética, más que para la DM1. A pesar de ello, la genética de esta forma de diabetes es aún poco clara (Expert Committee, 2003 a y b).

La DM2 implica, por lo tanto, alteración en la secreción de insulina y aumento de la resistencia a la acción de esta hormona, la cual en sus inicios la célula  $\beta$  pancreática deja de responder con incrementos adecuados en la secreción de insulina a los aumentos de la glucosa. Después, se produce elevación en la secreción de insulina, la cual se observa muy frecuentemente cuando existe la obesidad, exceso de consumo de grasas o inactividad física. En esta etapa intermedia el incremento en la insulinos secreción puede todavía ser suficiente, de tal suerte que la tolerancia a la glucosa se mantiene en límites normales; pero después progresa la deficiencia secretora de insulina y se genera resistencia a la insulina (Committee Report, 1997).

Con el paso del tiempo, el deterioro en la secreción de insulina empeora la tolerancia a la glucosa, aumentando la producción hepática de glucosa muy por encima de su requerimiento y se presenta la hiperglucemia en ayunas (Draznin, 1994).

#### **i) Prevalencia de DM2**

La DM2 la padecen entre el 80 y el 95% de los pacientes con DM (WHO, 2003; Wild y col., 2004). Sin embargo, existen notables variaciones de acuerdo a raza, país, grupo socioeconómico y presencia de otras condiciones como obesidad, dislipidemia e hipertensión (King y col., 1998).

Este trabajo hace especial referencia a la DM2, la cual es la más común y generalmente aparece en la edad adulta, es decir, después de los 40 años de edad (Expert Committee, 2003 a y b).

Se estima que el 50% de los individuos con DM2 no han sido diagnosticados aún y el 20% de los pacientes que se diagnostican con DM2 presentan datos de complicaciones crónicas en el momento del diagnóstico. La DM2 es la enfermedad endócrina más frecuente y de las principales causas de mortalidad en la sociedad contemporánea; por sí misma es un problema de salud pública frecuente y creciente en México. En el ámbito mundial el predominio de la DM2 ha incrementado dramáticamente en los últimos años debido a la falta de actividad física, obesidad y cambios en los hábitos alimenticios (<http://www.who.int/diabetes/en/>; WHO, 20012).

#### **c) DM gestacional**

La DM gestacional (DMG) se puede definir como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con reconocimiento durante el embarazo. La definición aplica sin considerar factores responsables como la insulina, la modificación en la dieta o si la condición persiste después del embarazo. En la mayoría de los casos de DMG, el metabolismo de la glucosa llega a ser adecuado después del parto (Expert Committee, 2003 a y 2003b).

#### **d) Otros tipos específicos**

Defectos genéticos de las células  $\beta$  pancreáticas. La forma más común está asociada al factor de transcripción hepático (HNF-1 $\alpha$ ). Una segunda forma se encuentra asociada con mutaciones en el gen de glucocinasa. La tercera forma está asociada con la mutación en el gen

HNF-4  $\alpha$ , factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de HNF-1  $\alpha$ . (Expert Committee, 2003 a y 2003b).

Defectos genéticos en la acción de la insulina, están asociadas con mutaciones en el receptor de insulina, los cuales abarcan desde hiperinsulinemia, hiperglucemia moderada hasta diabetes severa. Las mujeres, pueden llegar a virilizarse, ser grandes en estatura y presentar alteraciones en los ovarios. (Expert Committee, 2003 a y 2003b).

### **1.1.2 Factores de riesgo**

Algunos de los factores de riesgo más comunes para la diabetes son los siguientes: historia familiar con antecedentes diabéticos (DM1, DM2), historia familiar con enfermedades autoinmunes (DM1), madre muy joven o anciana (DM1), ser mayor de 40 años (DM2), presentar acumulación de grasa en la región abdominal del cuerpo (DM2), altos niveles de colesterol o triglicéridos en sangre (DM2) (Expert Committee, 2003 a y 2003 b).

Es importante mencionar que la hiperglucemia, genera un estado de glucotoxicidad, que induce procesos inflamatorios, acelerando las complicaciones de la DM, que afectan ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos, por mecanismos que aún no son claros. El estado inflamatorio se manifiesta presentando altos niveles de citocinas proinflamatorias y menor cantidad de citocinas antiinflamatorias. La producción de especies reactivas, como peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidroxilo, se incrementa en la DM2, provocando disminución de la actividad del sistema de defensa antioxidante y por otro lado la generación de radicales libres, que llevan al deterioro de estructuras celulares y de funciones fisiológicas. Esto provoca que el paciente diabético experimente daño endotelial vascular, pierda el control del tono vascular y se vuelva hipertenso, entre otros efectos (Watts y Payford, 1998; Kumar y Elbein, 2006; Wrigth y *col.*, 2006).

Desde la década pasada existe evidencia experimental, epidemiológica y clínica que indica un vínculo entre la inflamación y la diabetes tipo 2; dicha relación es establecida por ciertas moléculas características de la respuesta inflamatoria, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el cual es sobre expresado en tejido adiposo de ratones obesos, esto crea el primer indicio de la relación diabetes-inflamación. El TNF- $\alpha$  es una citocina proinflamatoria que activa varias cascadas de señalización, entre las cuales se encuentran inhibidores críticos de la acción de la insulina. Se ha observado que en los ratones obesos que carecen de la función de TNF- $\alpha$ , la sensibilidad a la insulina mejora y la homeostasis de la glucosa, lo cual confirma que la respuesta inflamatoria tiene un papel crítico en la regulación de la acción de la insulina (Hotamisligil, 2006).

## **1.2 Citocinas**

En la fase efectora de la respuesta inmune participan linfocitos T estimulados por antígeno, los cuales secretan mediadores proteínicos que activan varias poblaciones celulares, reclutándolas en el sitio de lesión. La más notable de estas poblaciones es la de los fagocitos mononucleares, que pueden secretar un segundo grupo de proteínas con posibilidad de influir en la reacción inmune. Estos derivados de linfocitos y fagocitos mononucleares fueron llamados linfocinas o monocinas, respectivamente. Posteriormente se descubrió que células que no forman parte del

sistema inmune eran capaces de secretar estas mismas proteínas y su nombre cambió a citocinas. Para que una proteína sea considerada citocina debe de cumplir con ciertas características mínimas: 1) estar involucrada en la reacción inflamatoria, 2) ser liberada como parte de la respuesta inmune a antígenos, 3) provocar la secreción de una segunda citocina por su célula blanco y 4) regular la actividad de otras citocinas en la misma célula blanco (Estrada, 2002).

Las interacciones entre citocinas pueden ser inhibitorias, aditivas, sinérgicas o pueden tener efectos nuevos no observados con cada una por separado. Así que el efecto preciso de una citocina será determinado por el contexto celular en el que actúa. Estas proteínas no siempre son secretadas; en algunos casos pueden ser expresadas en la superficie de la célula estimulada. Sin embargo, ambas comparten la misma acción: unirse a receptores específicos en la superficie de su célula blanco. Las citocinas no tienen actividad enzimática ni reactividad química, pero a través de la activación de sus receptores alteran el comportamiento de la célula blanco; en este sentido son similares a las hormonas. La célula blanco de la citocina puede ser la célula de origen (autócrina) o puede ser una célula cercana (parácrina). Cada citocina se une a un receptor de superficie celular específico generando cascadas de señalización que alteran la función celular. Esto incluye la regulación positiva o negativa de diversos genes y sus factores de transcripción que inducen la producción de otras citocinas, el aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas y la supresión de su propio efecto. Las citocinas pueden compartir funciones similares. Además, pueden actuar sobre diferentes tipos celulares y una célula puede expresar receptores para más de una citocina (Estrada, 2002). Las citocinas de elección para evaluar en este trabajo son: interleucina-6 (IL-6), adiponectina, resistina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), y sus principales características se describen a continuación.

#### **a) IL-6**

Interviene en la producción de inmunoglobulinas en la diferenciación de linfocitos B y activa a los linfocitos T. Es una glucoproteína secretada por los macrófagos, células endoteliales, células del sistema inmune, miocitos, fibroblastos y tejido adiposo. Cerca de la tercera parte de la concentración circulante proviene de este último; de esta manera, la concentración de IL-6 es proporcional a la cantidad de tejido graso. Se ha propuesto que IL-6 afecta la homeostasis de la glucosa, además precede a la inflamación menor y es un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 (**Tabla 1**). Es claro que la inflamación juega un papel importante en la DM2. Sin embargo, estudios realizados *in vitro* para demostrar el impacto del tratamiento de IL-6 en los islotes  $\beta$  pancreáticos no demostraron efectos consistentes de la IL-6 en la producción y liberación de insulina. Estudios adicionales demostraron que IL-6 inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes  $\beta$  pancreáticos de roedores (Krisriansen y Mandrup-Poulsen, 2005).

#### **b) Adiponectina**

Es sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo. Posee efecto antiinflamatorio y se ha asociado con el metabolismo de lípidos, con concentraciones altas de colesterol y bajas de triglicéridos. Se ha encontrado que es un modulador de la resistencia y la acción a la insulina,

siendo un indicador del desarrollo de DM2 (**Tabla 1**). Los niveles plasmáticos de adiponectina se encuentran significativamente reducidos en humanos con resistencia a insulina, DM2 y obesidad, al ser comparados con sujetos sanos (Schulze y col., 2004).

**Tabla 1.** Citocinas involucradas en etapas que preceden a la DM2

Citocina	Tipos celulares productores	Acción
IL-6	Células de sistema inmune (monocitos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T) células endoteliales, fibroblastos, miocitos y tejido adiposo.	Promueve síntesis de fibrinógeno, contribuyendo en la fase inflamatoria aguda; factor de crecimiento de las células $\beta$ ; coestimulador de las células T; inhibe la secreción de insulina estimulada por la glucosa; concentraciones elevadas durante años precede a la DM2
TNF- $\alpha$	Células del sistema inmune, astrocitos, miocitos y fibroblastos	Regulador de la sensibilidad a la insulina; factor proinflamatorio
Adiponectina	Tejido adiposo	Relacionado con el metabolismo de los lípidos; asociada con enfermedades relacionadas con la obesidad como la DM; su administración disminuye la resistencia a la insulina.
Resistina	Adipocitos	Asociada con la resistencia a la insulina en DT2.; involucrada en procesos inflamatorios; expresión regulada por IL-6 y TNF- $\alpha$ .

(Pang y Le, 2006; Kumar Das y Elbein, 2006; Kristiansen y Mandrup-Poulsen, 2005).

### c) Resistina

La resistina en ratón se encuentra casi exclusivamente en tejido adiposo, mientras que en humanos su expresión en tejido adiposo es muy baja, también es expresada en otros tejidos, como hueso, pulmón y células  $\beta$  pancreáticas. Cabe mencionar que los niveles de resistina se encuentran más altos en rata macho al compararlos con hembras, mientras que en el suero de humanos la resistina se encuentra más alta en mujeres que en hombres, lo cual indica que el género puede ser un factor que influye en su expresión y función. La expresión del gen de resistina se puede regular con derivados de tiazolidinedionas, insulina, glucosa, glucocorticoides y hormona de crecimiento. La resistina contribuye a la resistencia a insulina, y existen evidencias que apoyan que está involucrada en procesos inflamatorios (**Tabla 1**). Algunos agentes proinflamatorios como el TNF- $\alpha$  e IL-6 pueden regular la expresión del gen de la resistina. Los niveles de resistina en personas sanas se encuentran más elevados que en personas con DM1 (Pang y Le, 2006).

### d) TNF- $\alpha$

Es liberada por células del sistema inmune e interviene en la inflamación. Estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria. Ejerce diferentes funciones en distintos órganos, como la producción de otros mediadores, como las interleucinas 1 a la 6. Su liberación produce la activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de células inflamatorias, provocando la activación de linfocitos T y B. Las funciones de este factor se deben a su unión con diferentes receptores celulares que se localizan en distintas células, como neutrófilos, células endoteliales y

fibroblastos (**Tabla 1**). Cabe mencionar que estos receptores se encuentran en estado soluble en suero (Aguillón y col., 2002).

La hiperglucemia crónica induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS *del inglés reactive oxygen species*), entre otros efectos, por lo tanto, el estrés oxidante se incrementa y en ausencia de una respuesta compensatoria adecuada por parte de los sistemas antioxidantes endógenos, se activan vías de señalización intracelular sensibles al estrés; finalmente la producción de ERO provoca daño celular, siendo en parte, responsable de las complicaciones de la diabetes (Evans y col., 2002).

### 1.3 Radicales libres

En los elementos y en las moléculas los electrones se encuentran apareados y cada electrón del par muestra una rotación o giro opuesto. Un radical libre (RL) es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o por ganancia de ellos. La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula y la hace generalmente más reactiva que su correspondiente "no radical". Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales es muy variable. Los RL se pueden agrupar de la siguiente manera: los derivados del oxígeno, los metales de transición y el resto de los RL. La mayoría de los RL de interés para la biología o la medicina son los derivados del oxígeno. Pueden mencionarse los singuletes delta y sigma del oxígeno ( $^1O_2$ ), el radical superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). En la tabla periódica de los elementos, todos los metales de la primera fila en el bloque **d** contienen electrones sin aparear, de manera que pueden ser considerados como RL, excepto el Zn. De tal manera que Fe, Mn, Co, Ni y Cu están presentes en todas las células y tienen gran importancia biológica; algunos de ellos, como el Fe y el Cu se ubican en el centro activo de proteínas con o sin actividad enzimática y forman complejos proteínicos, en donde no se manifiestan sus propiedades como RL. El grupo del resto de los RL está constituido por elementos químicos como: S, N, Cl, C, etc., a los cuales puede o no asociarse el oxígeno, por ejemplo:  $SO^\bullet$ ,  $NO^\bullet$ ,  $Cl^\bullet$ ,  $CO^\bullet$ , etc. (Zentella de Piña y Saldaña, 1996).

Los RL derivados del oxígeno se producen normalmente en el cuerpo humano. Se calcula que parte del oxígeno que se respira es empleado para formar el radical superóxido ( $O_2^-$ ). También lo producen las células del sistema inmune, principalmente fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos). El radical  $\bullet OH$  se produce por las radiaciones provenientes del medio; las radiaciones electromagnéticas con baja longitud de onda pueden romper el agua y generarlos; este radical es muy reactivo y prácticamente interactúa con las estructuras moleculares más cercanas. El  $NO^\bullet$  es un segundo mensajero intracelular y participa en la regulación de la presión sanguínea, pero en exceso provoca daño tisular (Zentella de Piña y Saldaña, 1996).

Los radicales generados por el metabolismo existen en concentraciones muy bajas y su vida media es de unos cuantos microsegundos. Cuando un RL reacciona con un no radical, pueden formarse otros RL, como sucede en la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, en donde un RL iniciador remueve un átomo de hidrógeno de un metileno de la cadena de

carbonos. Este hecho deja un electrón desapareado en el átomo de carbono y se forma un radical de ácido graso; después de varios rearrreglos internos puede reaccionar con oxígeno y generar un radical peroxilo que es capaz de sustraer un segundo hidrógeno de otras moléculas de ácido graso, estableciéndose de esta manera una reacción en cadena (Zentella de Piña y Saldaña, 1996).

### 1.3.1 Estrés Oxidante

Cuando aumenta severamente la producción de RL en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes resulta ser ineficiente, se establece la situación conocida como estrés oxidante, el cual provoca daño celular, que llega a ser muy severo y puede conducir a la muerte celular. Existen sistemas protectores en las células que evitan el incremento excesivo de las especies oxidantes indeseables. Dentro de estos sistemas hay tres enzimas que son la piedra angular de esta protección: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH peroxidasa). La superóxido dismutasa, en la mitocondria, convierte al radical superóxido en agua oxigenada, esta enzima es dependiente de manganeso y en el citosol tiene como cofactores al cobre y al zinc. La glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa constituyen el segundo gran sistema antioxidante celular, la GSH peroxidasa, enzima citosólica cuyo cofactor es el selenio, transforma al peróxido de hidrógeno en dos moléculas de agua, participan en la reacción dos moléculas de glutatión reducido (GSH) que ceden dos hidrógenos y se forma entre ellas un enlace disulfuro (GSSH). El glutatión se regenera mediante la glutatión reductasa en presencia de NADPH. También los peróxidos de lípidos y los lipoperóxidos son reducidos en presencia de glutatión (**Figura 1**). La catalasa, enzima que se localiza en los peroxisomas, destruye al peróxido de hidrógeno por dismutación (Zentella de Piña y Saldaña, 1996).

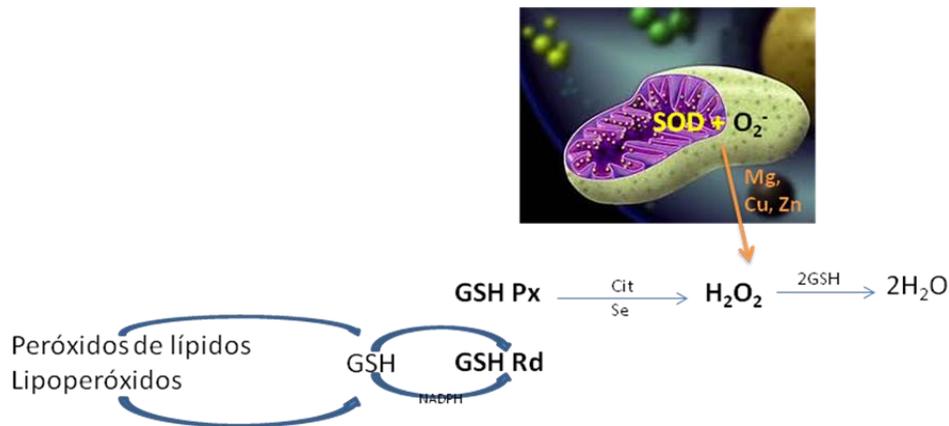


Figura 1. Sistemas enzimáticos antioxidantes.

### 1.3.2 Estrés Oxidante y DM2

Se considera que la producción del radical superóxido es un factor patogénico común que puede llevar al desarrollo de resistencia a la insulina, disfunción de la célula beta pancreática, deterioro en la tolerancia a la glucosa (DTG) y finalmente DM2, además de que se ha asociado a las complicaciones macro y microvasculares de la DM2. La abundancia de glucosa en sangre, así

como la acumulación de ácidos grasos en las células  $\beta$  pancreáticas, tejido muscular y adiposo llevan a la generación excesiva de ERO, particularmente  $O_2^-$ , a través del transporte de la cadena mitocondrial de electrones. Recientemente se ha sugerido que las oscilaciones en la concentración de glucosa sanguínea en personas con DMG y DM2 puede contribuir significativamente al estrés oxidante y quizás más que la concentración crónica elevada de glucosa (Wright y col., 2006).

La DM2 es regularmente acompañada por incremento en la producción de RL o deterioro en los sistemas de defensa antioxidante. Los mecanismos implicados en el incremento del estrés oxidante asociados con las complicaciones de la DM2, incluyen: activación de factores de transcripción, productos finales de glicación avanzada (AGE's *del inglés advanced glycated end products*) y la protein cinasa C. También, se cree que la oxidación de la glucosa pueda ser la principal fuente de RL. En su forma enediol, la glucosa es oxidada a un radical enediol que es convertido a cetoaldehídos reactivos y radicales  $O_2^-$  y éste se convierte, por dismutación, a peróxido de hidrógeno, el cual si no es degradado por la catalasa o la glutatión peroxidasa puede generar radicales hidroxilo extremadamente reactivos. En la hiperglucemia se promueve la peroxidación de lípidos, resultando en la generación de RL (Maritim y col., 2003).

#### **1.4 Metabolismo y DM2**

El metabolismo puede definirse como la suma de todas las reacciones químicas que ocurren en el organismo viviente. El metabolismo se divide en catabolismo y anabolismo. Catabolismo (del griego *katá* "abajo") se refiere a la secuencia de reacciones de degradación; anabolismo (del griego *ana* "arriba") se refiere a la secuencia de reacciones sintéticas. El término vía se utiliza por lo común para indicar una serie de reacciones consecutivas que efectúan una conversión global específica. Sin embargo, la clasificación no se limita a su función de degradación o síntesis, también incluyen los efectos de reducción u oxidación, energética secuencial de reacciones y naturaleza de los materiales iniciales y productos finales. En relación a la *oxidación y reducción*; no todos los pasos de una vía catabólica implican la oxidación de un intermediario metabólico, ni tampoco todos los pasos de una vía anabólica consisten en la reducción de un intermediario. Sin embargo, en las reacciones que se caracterizan de este modo, las coenzimas de nicotinamida adenina dinucleótido son participantes comunes. De manera más específica, en el catabolismo se usan las formas oxidadas ( $NAD^+$  y  $NADP^+$ ) y se producen las reducidas ( $NADH$  y  $NADPH$ ), mientras que en el anabolismo se necesitan las formas reducidas y se producen las formas oxidadas. Con respecto a la *energética*, el catabolismo es exergónico (generador de energía), de manera que tiene la necesidad de ADP para la producción de ATP. Luego, el ATP sirve como fuente de energía para las reacciones endergónicas (consumidoras de energía) del anabolismo, con formación de ADP (y AMP). Finalmente, en relación a *materiales iniciales, productos finales y metabolitos intermediarios*; los productos finales y los metabolitos intermediarios que se generan en el catabolismo sirven, por lo general, como materiales iniciales en el anabolismo y viceversa (Bohinski, 1991; Stryer y col., 2003).

#### 1.4.1 Metabolismo de los carbohidratos

En la DM2, existe transporte inadecuado de la glucosa a través de órganos y tejidos e ineficiencia en los sistemas enzimáticos intracelulares necesarios para su utilización. También se ha observado que el ritmo de la gluconeogénesis incrementa, disminuyendo la conversión de la glucosa en ácidos grasos a través de la acetil-CoA y la cantidad de glucosa oxidada, excepto en el cerebro (Bohinski, 1991; Lehninger, 1994).

Como resultado de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa, se incrementa en alta proporción la cantidad de nitrógeno en la orina (principalmente en forma de urea) de los pacientes con DM2, especialmente después de la ingestión de alimentos ricos en aminoácidos. El incremento de nitrógeno excretado junto con la glucosa que aparece en la orina indican que los esqueletos carbonados de los aminoácidos glucogénicos (por ejemplo: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina y glicina) pasan casi por completo a glucosa. En condiciones sanas, aproximadamente la tercera parte de los carbohidratos ingeridos puede convertirse a ácidos grasos y triglicéridos, en hígado y en depósitos de grasa. El incremento en el ritmo de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa en la DM2 indican que en el metabolismo del diabético se mantendrán grandes cantidades de glucosa en sangre durante largos periodos de tiempo. La pérdida constante de glucosa por la orina en la DM2, formada en gran parte a partir de los aminoácidos ingeridos o de la proteína corporal, explica en parte el gran apetito experimentado en estos pacientes junto con la pérdida de peso. En la DM2 la cantidad de glucosa oxidada es relativamente baja, excepto en el cerebro. El resto de los tejidos metabolizan una gran cantidad de ácidos grasos, especialmente en hígado, donde la cantidad de acetil-CoA formada a partir de aminoácidos excede la capacidad del ciclo de Krebs para oxidarla. El resto de la acetil-CoA se convierte en cuerpos cetónicos, cuya aparición en grandes cantidades en la sangre y orina constituye el estado patológico denominado cetoacidosis, el cual constituye una de las consecuencias de la DM2. Estas deficiencias metabólicas pueden invertirse al administrar insulina, la cual aumenta el ritmo de la eliminación de glucosa en sangre hasta sus concentraciones normales, incrementa la glucólisis y reprime la gluconeogénesis (Lehninger, 1994, Stryer y col., 2003).

Las tres vías metabólicas de la glucosa más importantes son la glucólisis, la gluconeogénesis y la vía de los fosfatos de pentosas, cuyos aspectos más importantes se resaltan en el **Tabla 2**.

En los diabéticos y personas que ingieren una dieta rica en lípidos el catabolismo de los ácidos grasos se incrementa. El resultado es la producción en exceso de acetil-CoA que es convertida a  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, lo cual provoca mayor producción de acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato, involucrados en el desarrollo de cetonuria, cetonemia y cetoacidosis. En tales procesos la enzima lactato deshidrogenasa resulta ser singularmente importante, como puede verse en el **Tabla 2** (Bohinski, 1991).

**Tabla 2.** Aspectos importantes de la glucólisis, gluconeogénesis y vía de los fosfatos de pentosas

Vía metabólica	Definición	Reacción Total	Enzimas reguladoras	Reacción catalizada
Glucólisis	Reacciones de oxidación de una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato	$\text{Glucosa} + 6 \text{ ADP} + \text{Pi} = 2 \text{ Lactato} + 2 \text{ ATP}$	Hexocinasa, 6-fosfofructocinasa, piruvato cinasa, lactato deshidrogenasa, P carboxilasa, FP carboxilasa, Fructosa 1,6 difosfatasa G6 fosfatasa Alanina aminotransferasa	G a G6F F6P a F 1,6diF, FP a P, P a L, P a OAA, OAA a FP, F 1,6diF a F6P, G6P a G Ala a P
Gluconeogénesis	Síntesis de glucosa a partir de sustratos diferentes a carbohidratos	$2\text{L} + 6 \text{ ATP} = \text{G} + 6 \text{ ADP} + \text{Pi} + 4 \text{ H}$	G6F Deshidrogenasa	G6F a gluconolactona 6 fosfato
Fosfatos de pentosas	Reacciones que proveen de NADPH necesario para la reducción del glutatión oxidado (GSSH) a glutatión reducido (GSH), mediante la glutatión reductasa	$\text{G6F} + \text{NADPH} + \text{H}_2\text{O} = \text{R5F} + 2 \text{ NADPH} + 2 \text{H} + \text{CO}_2$		

G = glucosa, G6F = glucosa 6-fosfato, Pi = fósforo inorgánico, ATP = adenosina trifosfato, ADP = adenosina difosfato, F6F = fructosa 6-fosfato, Fr 1,6 diF = Fructosa 1,6 difosfato, FP = fosfoenol piruvato, P = piruvato, L = lactato, ala = alanina, OAA= oxalacetato, Fr 6F = fructosa 6-fosfato, NADPH = nicotina adenina dinucleótido fosfato, R5F = ribosa 5-fosfato (Alberts et al., 1996; Stryer et al., 2003; Lehninger, 1994).

Existen ciertos aminoácidos que se encuentran involucrados en la formación de glucosa y se ha considerado que alanina es más importante; éste aminoácido se convierte a piruvato a través de la acción de la enzima alanina aminotransferasa, que se considera entre las enzimas importantes en la vía de la gluconeogénesis, como se observa en el **Tabla 2** (Lehninger, 1994).

A continuación se describirán las tres vías de reacción más importantes: glucólisis, gluconeogénesis y la vía de los fosfatos de pentosas (Katzung, 1999).

El primer punto de control de la vía es la entrada de glucosa a todas las células, principalmente a músculo (sensible a insulina) e hígado (no sensible a insulina). Sin embargo, aunque la entrada de glucosa al hígado no sea dependiente de insulina, sin la insulina la capacidad enzimática del hígado para la captación de glucosa disminuye. Esto explica en parte la disminución de la actividad de enzimas importantes de la glucólisis y gluconeogénesis. La entrada de glucosa en la célula no es por difusión simple, aunque se produce por mecanismo de transporte pasivo, mediante transportadores que se encuentran en la membrana celular. Esta captación de glucosa se realiza a través de los diferentes tipos de transportadores de glucosa (GLUT) y su función se muestran en la **Tabla 3** (Katzung, 1999).

**Tabla 3.** Localización y función de transportadores de glucosa.

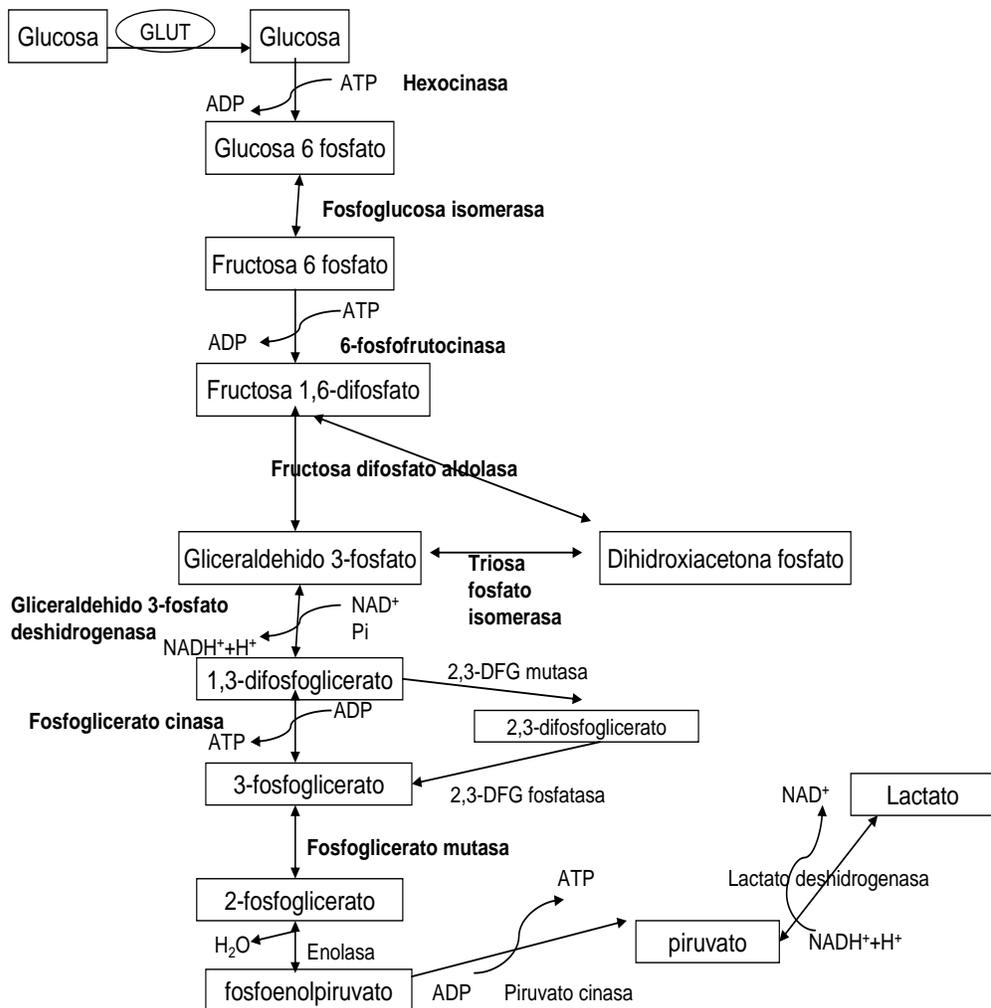
Transportador	Tejidos	Función
GLUT1	Todos los tejidos, especialmente eritrocitos y encéfalo.	Captación basal de glucosa; transporte a través de la barrera hematoencefálica.
GLUT2	Células $\beta$ del páncreas, hígado, riñón e intestino.	Regulación de la liberación de insulina y otros aspectos de la homeostasis de la glucosa
GLUT3	Encéfalo, riñón, placenta y otros tejidos.	Captación en neuronas y otros tejidos.
GLUT4	Músculo y tejido adiposo.	Captación de glucosa mediada por insulina.
GLUT5	Intestino y riñón.	Absorción intestinal de fructosa.

### a) Glucólisis

La vía de la glucólisis es un conjunto de reacciones que transforman una molécula de seis átomos de carbono (glucosa) en dos moléculas de tres átomos de carbono (piruvato) y rinde 2 moléculas de ATP aún en ausencia de oxígeno. Es una vía íntegramente citosólica. Este ciclo es catalizado por 11 enzimas que se encuentran en el citoplasma de la célula. La célula hidroliza dos moléculas de ATP para impulsar esta vía y produce cuatro moléculas de ATP, de manera que hay una ganancia neta de 2 ATP. Es el inicio de un proceso que puede continuar con la respiración celular (si existe oxígeno) o con la fermentación, en ausencia del oxígeno (Alberts y *col.*, 1996).

El ciclo se puede dividir en tres etapas (**Figura 2**). La primera consiste en la preparación (fase de 6-carbonos), activación de la glucosa con dos grupos fosfatos provenientes del ATP. La molécula de glucosa se divide en dos moléculas de tres carbonos, gliceraldehído-3-fosfato (G3F) y la dihidroxiacetona fosfato, ésta última luego se transforma en G3F, necesitando un aporte de energía en forma de hidrólisis de ATP para suministrar dos fosfatos. La segunda etapa consiste en la oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato a ácido carboxílico y la energía de esta reacción se acopla a la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, y la última etapa consiste en la transferencia de las moléculas de fosfato añadidas a los azúcares en la primer etapa, al ADP formando ATP, recuperándose así la inversión de dos moléculas de ATP hidrolizadas en la primer secuencia de reacciones (Alberts y *col.*, 1996).

Se considera que la acción de la hexocinasa, 6-fosfofructocinasa y piruvato cinasa regulan la glucólisis; sin embargo, en este trabajo también se considera importante la enzima lactato deshidrogenasa debido a que en los diabéticos y en personas que ingieren una dieta rica en lípidos, el catabolismo de los ácidos grasos se incrementa. El resultado es la producción en exceso de acetil-CoA. De esta manera, la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa resulta importante ya que está relacionada con la cantidad de piruvato que es convertido a lactato, lo cual impide la conversión de piruvato a acetil-CoA y, por tanto, la formación de cuerpos cetónicos; aunque también está involucrada en la gluconeogénesis (Bohinski, 1991; Stryer y *col.*, 2003).



**Figura 2.** Glucólisis. Cada una de las reacciones está catalizada por enzimas diferentes. En la reacción donde interviene la fructosa difosfato aldolasa, un azúcar de 6 carbonos es transformado en dos azúcares de tres carbonos, de manera que a partir de este paso el número de moléculas es el doble.

**i) Lactato deshidrogenasa**

En la última etapa de la glucólisis, el piruvato se reduce a lactato (**Figura 2**) a expensas de los electrones cedidos inicialmente por el 3-fosfogliceraldehído. Estos electrones son transportados por el nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), siendo éste oxidado a NAD<sup>+</sup>. Esta reacción completa el ciclo de óxido reducción de la glucólisis y es libremente reversible. Es considerada la mejor opción celular para la regeneración del NAD<sup>+</sup> citosólico bajo condiciones anaerobias. El lactato, producto final de la secuencia glucolítica en condiciones anaeróbicas, se difunde a través de la membrana celular hacia el entorno formando un producto de desecho. Cuando el tejido muscular trabaja en condiciones anaerobias por actividad física, el lactato que sale de las células musculares se dirige hacia la sangre y es recuperado por el hígado y destinado a formar glucosa. También participa en la formación de glucosa a partir de lactato, proceso que requiere ATP,

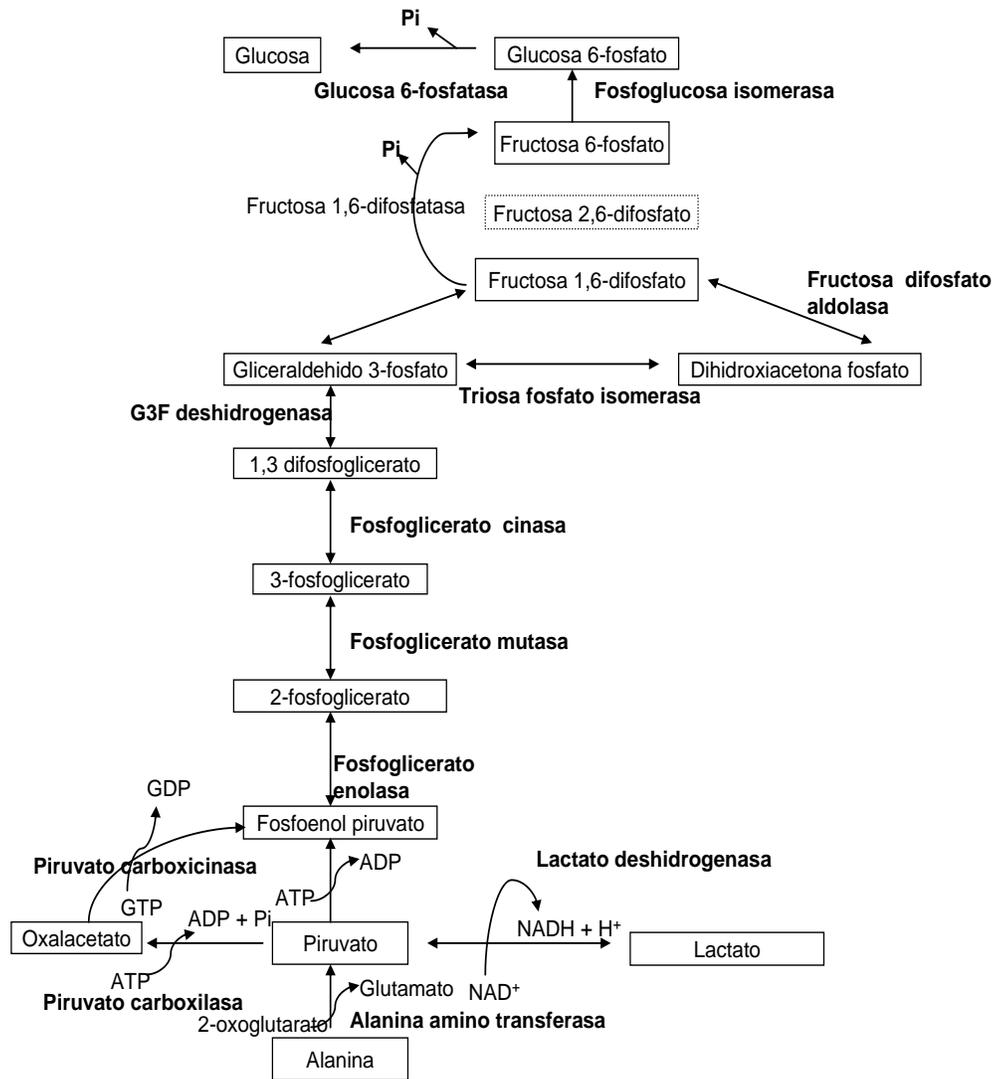
generando el NADH necesario para los pasos subsecuentes de la vía, puesto que el piruvato por sí mismo no puede ser convertido en fosfoenolpiruvato, debido a que la reacción que genera a este último en la glucólisis es irreversible en condiciones intracelulares (Lehninger, 1994; Stryer y col., 2003).

#### **b) Gluconeogénesis**

Síntesis de glucosa a partir de sustratos que no son carbohidratos, entre los que se encuentran: aminoácidos, lactato, piruvato, propionato y glicerol. La glucosa también es sintetizada a partir de fructosa y galactosa. Los niveles de glucosa plasmática son mantenidos también a través de esta vía, siendo la metformina el único medicamento en el mercado que actúa parcialmente inhibiendo la gluconeogénesis. Esta vía (**Figura 3**) es necesaria porque muchos órganos son completamente dependientes de glucosa, por ejemplo: cerebro, eritrocitos, músculo en condiciones de ejercicio, testículos, riñón, córnea y médula renal. Sin embargo, esta vía reduce la utilización de la glucosa que se encuentra en tejidos periféricos, favorece la movilización de lípidos, la formación de cuerpos cetónicos y sus efectos son opuestos a los de la insulina. Las reacciones reversibles de la glucólisis son empleadas en esta vía y las reacciones que son irreversibles son “rodeadas” por reacciones alternas que favorecen esta vía (Bohinski, 1991; Lehninger, 1994; Katzung, 1999).

La gluconeogénesis está regulada por las enzimas piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxicinasa, fructosa 1,6 difosfatasa y glucosa 6-fosfatasa. Por su importancia, en este trabajo se describe brevemente a continuación. La inhibición de las enzimas glucolíticas reguladoras incrementa la efectividad de esta vía. La gluconeogénesis también está sujeta a control hormonal por el glucagón y la insulina. El glucagón incrementa la concentración de ácidos grasos plasmáticos, al promover la lipólisis en tejido adiposo, debido a la gran disponibilidad de ácidos grasos se incrementa su oxidación en hígado, en éste tejido se promueve la síntesis de glucosa, efectos opuestos a los inducidos por insulina. Esta vía requiere de ATP para llegar a sintetizar una molécula de glucosa a partir de dos moléculas de lactato y seis ATP; este ATP es provisto en gran parte por la oxidación de los ácidos grasos, dicha oxidación se realiza en las mitocondrias del hígado, que promueve la formación de cuerpos cetónicos y la producción de ATP (Bohinski, 1991; Lehninger, 1994; Katzung, 1999).

### i) Glucosa 6-fosfatasa



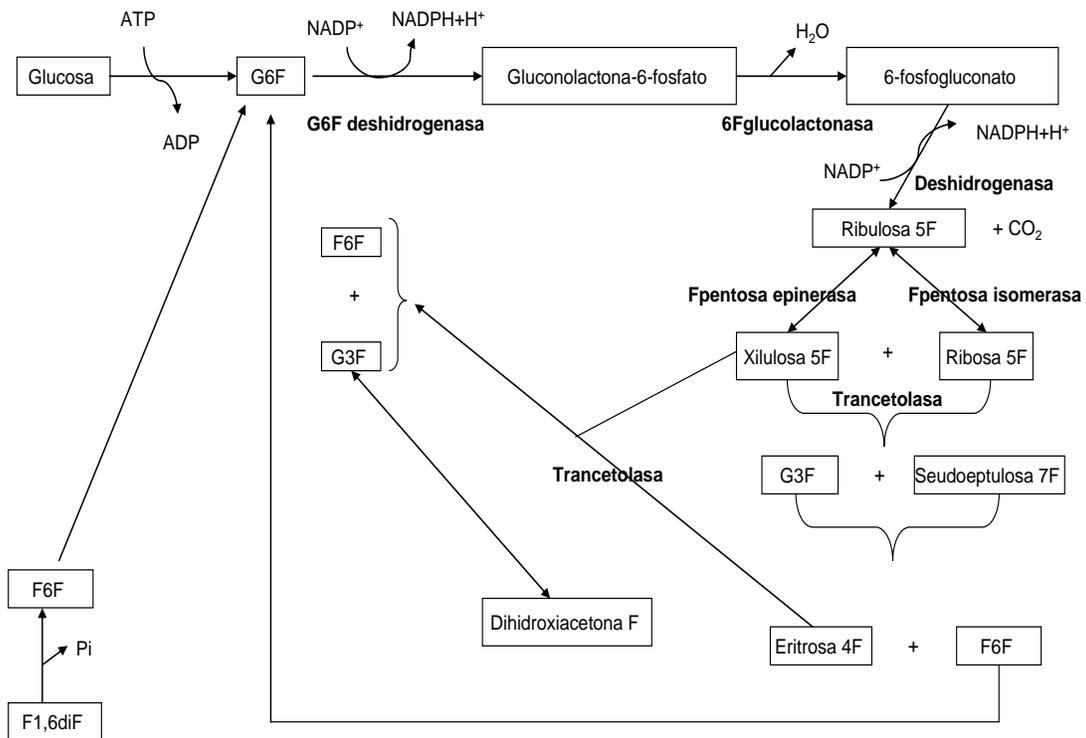
**Figura 3.** Gluconeogénesis. Entre los sustratos para la síntesis de glucosa se encuentran la alanina y el lactato. En esta vía están involucradas algunas de las enzimas glucolíticas que catalizan reacciones reversibles, siendo regulada por las enzimas que catalizan reacciones irreversibles.

Enzima que cataliza la conversión irreversible de G6F a glucosa (**Figura 3**), esta enzima se encuentra asociada a la membrana en el retículo endoplásmico, junto con su sitio activo disponible para su hidrólisis. Es necesaria una translocasa para mover la G6F del citosol al retículo endoplásmico. Se encuentra en hígado y riñón, pero no en músculo, por lo que sólo estos tejidos pueden proveer de glucosa al organismo por medio de la gluconeogénesis. De esta manera, la G6F generada por la degradación de glucógeno en músculo no es transportada al torrente sanguíneo (Lehninger, 1994; Stryer y *col.*, 2003).

### c) Fosfatos de pentosas

La glucosa usada por esta vía en los eritrocitos provee de NADPH, necesario en estas células para mantener el nivel de glutatión reducido. Éste juega un papel muy importante en la

destrucción del peróxido de hidrógeno, mediante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El NADPH es necesario para la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), mediante la glutatión reductasa. Esto es muy importante ya que el peróxido provoca daño oxidante irreversible a membranas, ADN y otros componentes celulares que pueden llegar a ser destruidos. Esta vía también suministra fosfatos de ribosa, necesarios para la síntesis de nucleótidos, tales como el ATP y ácidos nucleicos, encontrados en ADN y ARN.



**Figura 4.** Vía de los fosfatos de pentosas, de hexosas monofosfato o vía del fosfogluconato. En el hígado, aproximadamente el 30% de la oxidación de la glucosa se lleva a cabo por esta vía; también produce ribosa fosfato necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y provee un mecanismo para la utilización metabólica de azúcares de cinco átomos de carbono ingeridos en la dieta.

La vía es totalmente activa en cerebro y eritrocitos. La generación de NADPH es un proceso muy importante en tejido adiposo, debido a que necesita cantidades considerables de NADPH en la síntesis de ácidos grasos. La vía de fosfatos de pentosas no requiere ni genera ATP. El carbono uno de la G6F es liberado como  $\text{CO}_2$  y dos moléculas de NADPH son generadas por cada G6F que entra al ciclo. Esta vía se produce en dos etapas; la hexosa es descarboxilada a pentosa y la segunda comprende reacciones de oxido-reducción para la generación de NADPH. Esta vía se regula a través de la acción de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Lehninger, 1994; Stryer y col., 2003).

### i) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

La primera reacción irreversible oxidativa de la vía de los fosfatos de pentosas es la deshidrogenación enzimática de la G6P para formar gluconolactona-6-fosfato y NADPH, y es catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (**Figura 4**), enzima específica para NADP<sup>+</sup>. Esta enzima puede ser inhibida por niveles altos de NADPH (Stryer *y col.*, 2003).

### 1.5 Diagnóstico de la diabetes

Existen diferentes tipos de pruebas para diagnosticar diabetes, entre las cuales se encuentran: la glucosa plasmática en ayuno (GPA), prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub> o A<sub>1c</sub>). Sin embargo, estas pruebas presentan diferentes sensibilidades, ventajas y desventajas. Por ejemplo la GPA es menos sensible que la PTGO, debido a que esta última fue diseñada especialmente para detectar anomalías en el metabolismo de la glucosa en pacientes con niveles normales de GPA. La PTOG ha llegado a ser conveniente para detectar alteraciones de los valores de glucosa sanguínea en pacientes que no han sido sometidos a ayuno. Esta prueba ha llegado a ser el “estándar de oro” de las pruebas para el diagnóstico de diabetes. Por su parte, la determinación de A<sub>1c</sub>, es capaz de indicar un estado crónico de hiperglucemia, no siendo necesario un estado de ayuno para la realización de la prueba, la muestra sanguínea puede ser tomada en cualquier momento del día (Expert Committee, 2003 b).

Estas pruebas requieren una pequeña muestra sanguínea, obtenida mediante el pinchar la yema de un dedo con una lanceta. La glucosa plasmática se determina usando tiras reactivas o un equipo para su determinación cuantitativa. Las tres posibles maneras de emitir un diagnóstico positivo para diabetes son las siguientes: Síntomas diabéticos más concentración de glucosa plasmática en cualquier momento del día  $\geq$  a 200 mg/dL (11.1 mmol/L), glucosa plasmática en ayuno  $\geq$  126 mg/dL (7.0 mmol/L), el ayuno está definido como la ausencia de ingesta de calorías en un periodo mínimo de 8 horas, durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa, después de dos horas de ingerir 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua  $\geq$  a 200 mg/dL (11.1 mmol/L). No se recomienda realizar esta prueba en un estudio clínico rutinario (Expert Committee, 2003 a y b).

### 1.6 Control

Los principales objetivos del control de la DM son: 1) mantener los niveles de glucosa en sangre, así como los de lípidos y lipoproteínas, en rangos normales o cercanos a éstos, con el propósito de prevenir o reducir los riesgos de las complicaciones vasculares de la DM, 2) prevenir y tratar las complicaciones de la DM mediante dieta y ejercicio, 3) administración de insulina o antidiabéticos orales cuando la dieta o el ejercicio no son suficientes para reducir la glucemia. De esta manera, los pilares del tratamiento del diabético son: régimen dietético, ejercicio, educación del paciente y tratamiento farmacológico (Mayer, 1991; ADA, 2004).

#### 1.6.1 Dieta

Con la dieta se propone mantener o disminuir el peso corporal de los pacientes en los límites fisiológicos. Para lograr esto, es necesario la ingesta de alimentos en pequeñas cantidades

a lo largo de todo el día para no sobrepasar la capacidad de metabolización de la insulina; es decir, la mínima cantidad de calorías por kilogramo de peso en relación con la actividad física del paciente; evitar el aumento en la ingestión de alimentos ricos en lípidos y proteínas, son preferibles los polisacáridos a los azúcares sencillos, debido a que los primeros deben ser divididos a azúcares más sencillos en el tracto gastrointestinal y, por tanto, el ascenso en el nivel de glucosa en la sangre se produce de manera más progresiva, reduciendo con ello el trabajo de las células  $\beta$  pancreáticas. Por último, la dieta debe de estar relacionada con las costumbres del paciente (Moore y col., 2004; ADA, 2004). Además, es importante corregir las eventuales alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y proteínas (Goodman y Gilman, 1996).

### **1.6.2 Ejercicio**

El ejercicio juega un papel muy importante en el control de la DM2, debido a que permite la disminución de los niveles de glucosa plasmática y ayuda a que la insulina trabaje de manera más eficiente. Contribuye a la disminución de peso corporal; el ejercicio, también incrementa la salud cardiovascular, mejorando la presión sanguínea y reduciendo el riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, a pesar de los beneficios de comenzar una rutina de ejercicios que se traduce en mejor salud, a la mayoría de las personas les resulta muy difícil establecer un programa de ejercicio durante un periodo prolongado. Por lo que es necesario establecer estrategias para desarrollar rutinas de ejercicio que promuevan la regularidad de este en los pacientes.

### **1.6.3 Tratamiento farmacológico**

#### **1.6.3.1 Insulina**

La insulina es liberada a través de las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a diversos estímulos, tales como: altas concentraciones de ATP, glucosa, manosa, leucina y arginina (Katzung, 1999). De manera particular, la liberación de insulina estimulada por glucosa es resultado de un estado de hiperglucemia que incrementa los valores intracelulares del ATP, que provoca el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). La disminución de la corriente eferente de potasio, a través de este conducto, origina la despolarización de las células  $\beta$  y apertura de conductos de calcio sensibles a cambios de voltaje. El aumento de calcio intracelular que se presenta desencadena la secreción de la insulina (Doyle y Egan, 2003), para que ésta se una a los receptores de membrana de sus tres órganos blanco con el objetivo de introducir la glucosa a las células y, en caso de que haya exceso, almacenarla en forma de glucógeno. Al unirse la insulina a receptores membranales en hepatocitos, provoca el incremento de la actividad de la glucógeno sintetasa y su unión a receptores de membrana en adipocitos y células musculares provoca la exocitosis y activación de los transportadores de glucosa, aumentando la captación de glucosa (Katzung, 1999; Silberberg y Van Breemen., 1991; Lodish y col., 2002; Procks y col., 2002).

En todos los pacientes con DM1 se emplea insulina para controlar sus niveles de glucosa plasmática; una pequeña cantidad de los pacientes con DM2 también emplea insulina. La insulina

es inyectada por debajo de la piel y es absorbida rápidamente. Existen varios tipos de insulina disponibles comercialmente y pueden ser clasificados de acuerdo a la velocidad con la que ejercen su acción y el tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo. Los tipos más comunes de insulina son los siguientes: a) insulina de acción ultra breve. Cuando la insulina (lispro) se inyecta por vía subcutánea, se absorbe rápidamente logrando concentraciones séricas máximas en una hora. El tiempo óptimo de la aplicación preprandial de este tipo de insulina es de 20 a 60 min y en pacientes con DM1 que reciben terapia intensa de insulina, permanece en torrente sanguíneo de 4 a 12 horas; b) insulina de acción breve. La insulina regular está asociada a zinc, es cristalina, soluble, de acción breve y sus efectos son evidentes 30 min después de la inyección subcutánea y, por lo general, permanece de 5 a 7 horas en el torrente sanguíneo. Es particularmente útil para el tratamiento intravenoso en el manejo de la cetoacidosis diabética y cuando los requerimientos de insulina cambian rápidamente, como después de una cirugía o durante infecciones agudas; c) insulinas de acción intermedia y de acción prolongada. Estos tipos de insulina al administrarse en forma subcutánea se absorben rápidamente con acción prolongada, alcanzando sus valores máximos plasmáticos entre la primera y tercera hora después de la aplicación y permanece en sangre por un periodo de 18-26 horas (Katzung, 1999).

#### 1.6.3.2 Agentes hipoglucemiantes orales (AHO)

Entre los AHO más usuales se encuentran las biguanidas, los inhibidores de alfa-glucosidasas, los derivados de las tiazolidinedionas y las sulfonilureas (SU).

##### a) Biguanidas

Hace más de 30 años varias biguanidas (metformina, fenformina y buformina) se usaban en el control de la DM, sin embargo, en los Estados Unidos de Norte América fueron retiradas del mercado en 1970 debido a que se les asoció con acidosis láctica y no fue sino hasta 1995 que se aprobó para su uso (Katzung, 1999).

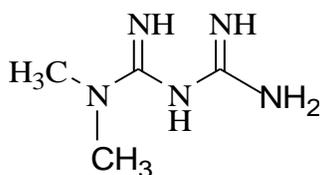


Figura 5. Metformina

##### l) Eficacia y uso clínico

La metformina (**Figura 5**) parece tener efectos benéficos en lo que respecta al control glucémico. Está asociada a pérdida de peso. El perfil de lípidos de pacientes diabéticos tratados con metformina, indica la disminución de los valores plasmáticos de ácidos grasos, triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad, estos resultados se reflejan en un efecto cardiovascular benéfico. La metformina puede ser empleada en el control de la diabetes como monoterapia con otros AHO o en combinación con la insulina. Es recomendada como terapia primaria en el caso de

pacientes DM2 con exceso de peso. La dosis inicial es de 500 mg por día que se va incrementando hasta una dosis máxima de 1000 mg dos veces al día (Katzung, 1999; Cheng y Fantus, 2005).

## II) Efectos secundarios y contraindicaciones

Los efectos secundarios gastrointestinales observados en los pacientes con DM2, dependiendo de la dosis, son: dolor abdominal, anorexia, diarrea, hinchamiento. Estos efectos secundarios regularmente se mejoran con el uso continuo a dosis pequeñas (250-500 mg/día), dicha dosis debe de incrementarse muy lentamente. Cuando la secreción de insulina no ha sido alterada, no se presenta hipoglucemia con el uso de metformina. Su uso no se ha relacionado con acidosis láctica. La metformina puede ser empleada con extrema precaución y en dosis pequeñas en pacientes con disfunción renal moderada (Katzung, 1999; Cheng y Fantus, 2005).

## III) Mecanismo de acción

Las biguanidas ejercen acciones extrapancreáticas, su principal mecanismo de acción es aumentando la sensibilidad a la insulina en tejido hepático: disminución de la glucogenólisis (liberación hepática de glucosa) y gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de otros sustratos como aminoácidos o glicerol). También aumenta la sensibilidad a la insulina en tejido periférico (principalmente en músculo) directa e indirectamente (por disminución del efecto tóxico de la hiperglucemia). La metformina no tiene efecto directo sobre las células beta. La metformina activa la proteína cinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) hepáticas y musculares. La activación hepática de AMPK resulta en la fosforilación e inhibición de acetil-CoA carboxilasa, la cual cataliza un paso limitante en la lipogénesis. Este bloqueo en la síntesis de los ácidos grasos promueve la oxidación de los ácidos grasos. En general, la activación de AMPK hepática disminuye la expresión de un elemento regulador de esteroles de unión a proteína (SREBP-1), factor de transcripción implicado en la patogénesis de la resistencia a la insulina. La disminución de la expresión de SREBP-1, resulta en la disminución de la expresión de enzimas lipogénicas, las cuales además contribuyen a la disminución en la síntesis de triglicéridos. La activación de AMPK es esencial en la disminución de la producción de la glucosa hepática y el incremento en el consumo de glucosa por parte del músculo esquelético. De esta manera AMPK, es el mayor regulador en el metabolismo de lípidos y glucosa y puede ser un mediador clave de los efectos de la metformina. Otros efectos tales como el incremento en la expresión de hexocinasa muscular y el transportador de glucosa sensible a insulina, parecen ser fenómenos secundarios. Es excretada sin modificar por los riñones (Zhou y col., 2001; Zou y col., 2004; Cheng y Fantus, 2005).

### b) Inhibidores de alfa glucosidasas

Los inhibidores de alfa glucosidasas disponibles en México, Canadá y Estados Unidos, son la acarbosa (**Figura 6**) y el miglitol (Katzung, 1999).

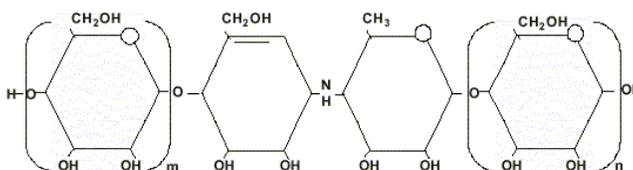


Figura 6. Acarbosa

### I) Eficacia y uso clínico

La disminución de los niveles plasmáticos de glucosa es menor comparado con otros AHO. Se ha demostrado una pequeña disminución en los valores de triglicéridos, son poco usados como monoterapia y no son recomendados para la hiperglucemia moderada o severa inicial ( $A_{1C} \geq 9.0\%$ ). Sin embargo es muy útil en combinación con otros AHO. La dosis inicial es de 25 mg/día y se va incrementando hasta tolerar 100 mg tres veces al día. La dosis límite de tolerancia para los efectos secundarios gastrointestinales es de 50 mg (Cheng y Fantus, 2005).

### II) Efectos secundarios y contraindicaciones

Los principales efectos secundarios de estos AHO son gastrointestinales. Específicamente, inflamación, dolor abdominal, diarrea y flatulencias. Sin embargo, si se inicia el tratamiento con la dosis mínima y se va incrementando paulatinamente, los efectos secundarios disminuyen. Con el uso de este tipo de AHO no se presentan casos de hipoglucemia. Sin embargo, están contraindicados en pacientes con colón irritable o disfunción severa en riñones o hígado (Marcy y col., 2004; Cheng y Fantus, 2005).

### III) Mecanismo de acción

Esta clase de AHO inhibe en forma competitiva las enzimas intestinales, responsables de la absorción de oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) presentes en las vellosidades intestinales, demorando la digestión de los hidratos de carbono con reducción de los picos glucémicos postprandiales. También actúan disminuyendo la secreción de polipéptidos intestinales (Marcy y col., 2004).

### c) Derivados de las tiazolidinedionas

En este tipo de AHO se encuentran las glitazonas ciglitazona, englitazona, pioglitazona (Figura 7), troglitazona y rosiglitazona (Katzung, 1999; Flores-Saénz y col., 2003).

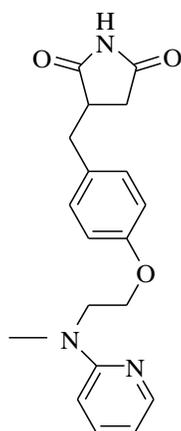


Figura 7. Pioglitazona

### **I) Eficacia y Uso clínico**

La eficacia de troglitazona durante un periodo de hasta 12 semanas, produce la disminución de la resistencia a la insulina, disminuye la insulinemia y mejora la hiperglucemia tanto en ayuno como posprandialmente en pacientes con DM2 (Katzung, 1999).

### **II) Efectos secundarios y contraindicaciones**

Estudios realizados con estos hipoglucemiantes han mostrado que pueden provocar hepatotoxicidad, con niveles anormales de alanina-aminotransferasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina (Marcy y *col.*, 2004).

### **III) Mecanismo de acción**

Son agonistas receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR-gamma). Actúan a través de la activación del receptor PPAR-gamma, reduciendo con ello la resistencia a la insulina, fundamentalmente a nivel de tejidos periféricos (tejido graso y muscular), aunque también tienen un cierto efecto a nivel del tejido hepático (inhibición de la gluconeogénesis hepática). También han sido recientemente asociadas con adicionales efectos antiinflamatorio y antioxidante (Doyle y Egan, 2003; Flores-Saenz y *col.*, 2003; Marcy y *col.*, 2004).

### **d) Incretinas**

Hormonas que son liberadas del estómago al torrente sanguíneo en respuesta a la ingesta de alimentos y entonces modulan la respuesta de la insulina sobre los nutrientes ingeridos. De naturaleza insulínótropicas (inducen la secreción de la insulina). Existen dos tipos de incretinas, la péptido insulínótropica dependiente de glucosa y péptido-1 similar al glucagón (GIP y GLP-1 de sus siglas en inglés; Kim y Egan, 2008).

### **I) Eficacia y uso clínico**

El efecto de GIP sobre la secreción de insulina es dependiente de glucosa, aumentando la velocidad de entrada de glucosa a los tejidos, es importante mencionar que dicha acción no provoca el incremento en la concentración plasmática de GIP. Es sintetizada y liberada en el duodeno y yeyuno y rápidamente degradada por la dipeptidil peptidasa 4 (DPP4; Kim y Egan, 2008). La GLP-1, es más relevante en la homeostasis de la glucosa y es sintetizada en el íleon y el colon, incrementa la secreción de insulina postprandial dependiente de glucosa en las células  $\beta$ -pancreáticas, tiene una vida media aproximada de 1-2 minutos como resultado de la inactivación por la DPP4. La exendina-4 un análogo de GLP-1, tiene una vida media de 2.4 h y es necesaria su administración dos veces al día antes de los alimentos, por su parte la liraglutida contiene palmitoil, lo que permite que sea menos susceptible a ser inhibida por la DPP4, por lo que su vida media es de 12.6 h permitiendo una dosis única (Freeman, 2012).

### **II) Efectos secundarios y contraindicaciones**

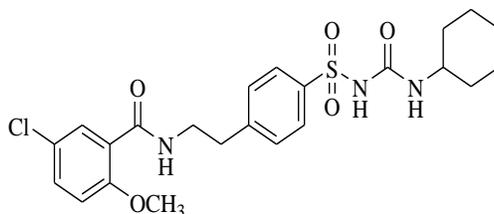
Los mayores efectos adversos de la exenatida son náuseas y vómito, los cuales son dosis-dependiente (Freeman, 2012).

### III) Mecanismo de acción

GIP, promueve la biosíntesis de insulina así como la proliferación y supervivencia de las células pancreáticas  $\beta$ . La unión del agonista o ligando de la incretina a su receptor resulta en la producción de AMPc, por la activación de la adenilato ciclasa y la activación de la proteína cinasa A (PKA) y factores de intercambio de nucleótidos de guanina regulados por AMPc, los cuales llevan a la elevación de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$  producido por la despolarización de la membrana plasmática por la inhibición de los canales de potasio sensibles a ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) y canales  $\text{K}_v$  después de la generación de ATP inducido por la glucosa, lo que provoca la apertura de los canales de calcio tipo L operados por voltaje y son fosforilados vía PKA, lo que aumenta de su probabilidad de apertura y por lo tanto, facilitan el incremento de la entrada de calcio. Los cambios en la concentración de calcio intracelular resultan en la fusión de vesículas que contienen insulina a la membrana plasmática, lo que culmina en su exocitosis de las células pancreáticas  $\beta$ . El tratamiento a largo plazo con GLP-1 también estimula la expresión del transportador GLUT2 y la glucocinasa, lo que resulta en el incremento en la síntesis de ATP mitocondrial (Kim y Egan, 2008).

#### e) Sulfonilureas

Las SU son los AHO más empleados en la actualidad para el tratamiento de la DM2. La tolbutamida y la cloropropamida pertenecen a la primera generación, mientras que la glibenclamida (**Figura 8**), glipicida y glimepirida pertenecen a la segunda generación (Katzung, 1999).



**Figura 8.** Glibenclamida

Los principales fármacos orales disponibles para el tratamiento de la hiperglucemia en pacientes con DM2 son las SU. Se caracterizan por la presencia de 1 ó 2 grupos aromáticos y un residuo nitrogenado de la fracción urea. En el caso de tolbutamida y tolazamida, el único grupo bencílico se presenta en la posición para ( $p$ ), los sustituyentes  $\text{CH}_3$  y  $\text{SO}_2$ , a diferencia de la cloropropamida y acetohexamida que presentan grupos  $\text{Cl}$  y  $\text{SO}_2$  ó  $\text{CH}_3$  -CO- y  $\text{SO}_2$ , respectivamente. La glipicida, al igual que la glibenclamida, posee dos grupos bencílicos cuyos sustituyentes en la posición  $p$  son  $\text{CH}_3$  y CO ó  $\text{Cl}$  y  $\text{OCH}_3$ , respectivamente (Katzung, 1999).

#### I) Eficacia y uso clínico

Las SU reducen las concentraciones de  $\text{A}_{1\text{C}}$  (1-1.5%). En general es mejor comenzar con una dosis baja e ir incrementando gradualmente durante una o dos semanas hasta alcanzar el control glucémico y evitar la hipoglucemia, particularmente en pacientes de edad avanzada. La dosis de administración de la glimepirida es de 1, 2 ó 4 mg una vez al día; en el caso de la glibenclamida, la dosis de administración es de 2.5 mg dos veces al día. Las SU se absorben en el

tracto gastrointestinal. En el plasma 90 a 99% de ellas se encuentran unidas a proteínas, especialmente albúmina. Son metabolizadas en el hígado y eliminadas en la orina. La mayoría de las SU son más efectivas cuando se administran media hora antes de la comida, que es el tiempo necesario para alcanzar una concentración óptima en el plasma (Contreras y col., 2002b; Cheng y Fantus, 2005).

## II) Efectos secundarios y contraindicaciones

El principal efecto secundario de las SU son hipoglucemia y ganancia de peso corporal. Debido a que las SU estimulan directamente la secreción de las células  $\beta$  pancreáticas de forma independiente de los niveles de glucosa plasmática. No se recomienda su uso en pacientes con alergia a las sulfonamidas (Cheng y Fantus, 2005).

## III) Mecanismo de acción

Se conocen al menos tres mecanismos de acción de las SU: liberación de insulina a partir de las células  $\beta$  pancreáticas, reducción de las concentraciones séricas de glucagón, efecto extra pancreático para potenciar la acción de la insulina en los tejidos blanco (Kaku y col., 1995; Katzung, 1999; Procks y col., 2002).

El primer mecanismo se considera como el más importante y se lleva a cabo por la unión de las SU al receptor SUR. Estos agentes ejercen su acción hipoglucemiante al bloquear los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ) en las células pancreáticas beta (Contreras y col., 2002b). Así, su acción se inicia después de la unión al receptor SUR, subunidad de los canales  $K_{ATP}$ , provocando el bloqueo de estos últimos (Litter, 1998; Procks y col., 2002; Fonseca y col., 2004; Hamaguchi y col., 2004). A través de este mecanismo se ha demostrado que las SU provocan incremento en la secreción de insulina endógena, lo que disminuye el requerimiento de insulina exógena, sin disminución en los niveles de triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad y colesterol (Stuart y col., 1997).

Cabe señalar que los canales de  $K_{ATP}$  se localizan también en las membranas plasmáticas de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (Goodman y Gilman, 1996; Litter, 1998; Katzung, 1999; Brayden, 2002; Procks y col., 2002; Cyrino y col., 2003), lo que ha permitido emplear estos tejidos como modelos experimentales, *in vitro*, en la investigación y descubrimiento de nuevos compuestos hipoglucemiantes bloqueadores de los canales de  $K_{ATP}$  (Jones y col., 1997).

### e.1 Canales $K_{ATP}$

#### a) Estructura

Los canales  $K_{ATP}$  son heterodímeros compuestos por dos diferentes subunidades SUR (receptor de SU) y Kir (rectificador interno de potasio), ambas subunidades se ensamblan para formar un poro (**Figura 10**) (Nagashima y col., 2004).

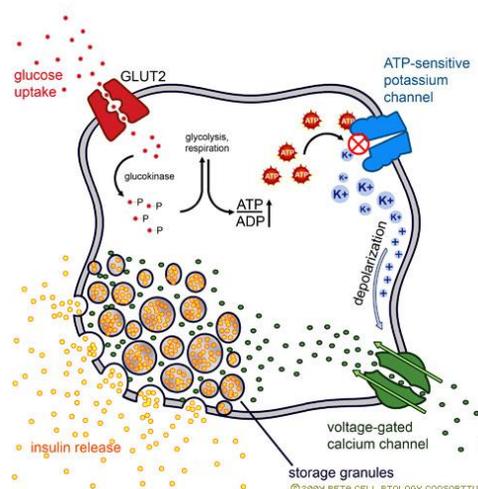
#### b) Localización y función fisiológica

Los canales  $K_{ATP}$  se encuentran en varios tejidos musculares, incluyendo músculo liso vascular, músculo cardíaco y músculo esquelético, así como en algunas neuronas del sistema

nervioso central. En todos estos tejidos los canales  $K_{ATP}$  responden de igual forma a las SU y a concentraciones altas de ATP, contribuyendo al tono del músculo liso vascular y en consecuencia a la presión sanguínea; estos canales también están involucrados en la respuesta de isquemia cerebral y cardiaca. En las células  $\beta$  pancreáticas los canales  $K_{ATP}$  juegan un papel muy importante en la regulación de la secreción de insulina inducida por SU (Liss y Roeper, 2001; Brayden, 2002, Procks y col., 2002; Nakaya y col., 2003).

Tanto SUR como Kir se asocian de manera específica de acuerdo al tejido en donde se localizan (**Tabla 4**). Sin embargo, se ha observado que la glibenclamida bloquea los canales que poseen SUR1 y SUR2. También se ha demostrado que el incremento en la concentración de ATP aumenta la eficacia de la glibenclamida para bloquear los canales que posean SUR1 (Procks y col., 2002); esto se puede explicar en parte debido a que esta subunidad tiene dos sitios de unión para glibenclamida a diferencia de las otras SU, tales como tolbutamida, cloropropamida, acetohexamida, tolazamida, etc., para las cuales sólo existe un sitio de unión (Ashfield y col., 1999).

En las células  $\beta$  pancreáticas, Kir 6.2 no puede formar por si sola el canal funcional, necesita la presencia de Sur1, de esta manera la subunidad SUR funciona como chaperona de la subunidad Kir 6.2. Cuando la relación ATP/ADP es baja el ATP se une a NBF1 y el ADP a NFB2 de SUR1. La relación entre Kir 6.2 y SUR1 en esta conformación es tal que el canal es abierto y el ATP no se une a Kir 6.2. Al unirse las SU a SUR, en la células pancreáticas beta se induce un cambio conformacional en el receptor, inhibiendo la salida de potasio de la célula que resulta en la despolarización de la membrana celular, provocando la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje. El aumento en la concentración de calcio en la célula produce la exocitosis de los gránulos secretores de insulina hacia la membrana plasmática y la liberación de dicha hormona (Ashfield y col., 1999; Ashcroft y Gribble, 2000; Nichols y Koster, 2002, Procks y col., 2002; Cheng y Fantus, 2005).



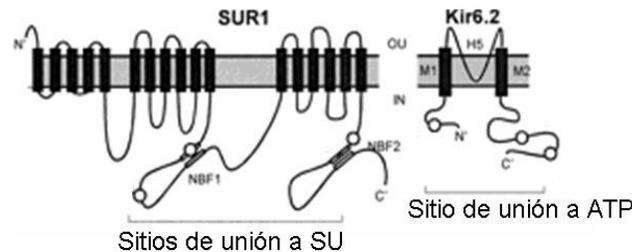
**Figura 9.** Liberación de insulina estimulada por glucosa.

La glibenclamida es la SU más potente utilizada hasta ahora como bloqueadora de los canales  $K_{ATP}$ . Su acción provoca el cierre de los canales de potasio y la apertura automática de los canales de calcio. El incremento de la concentración citoplasmática de calcio es el responsable de la liberación de insulina (Katzung, 1999; Procks y col., 2002).

**Tabla 4.** Canales  $K_{ATP}$  específico para cada tipo de tejido.

Tipo de canal $K_{ATP}$	Subunidad Kir	Subunidad SUR
Células $\beta$ -pancreáticas	6.2	1
Músculo cardíaco y esquelético	6.2	2A
Músculo liso	6.2	2B
Músculo vascular	6.1	2B

Coppack y col., 1990; Nagashima y col., 2004.



**Figura 10.** Topología del receptor SUR1 y la subunidad Kir 6.2. La hidrólisis de nucleótidos en SUR1 en el sitio de unión a nucleótidos (NBFs) o la unión de MgADP contrarresta el efecto inhibitorio del ATP (Nichols y Koster, 2002).

Debido a que la glibenclamida actúa a través de canales de potasio en la membrana de las células  $\beta$  del páncreas, los estudios *in vitro* para probar sustancias hipoglucemiantes cuyo mecanismo de acción sea similar al de las SU, se pueden realizar en el músculo liso vascular, el cual posee canales de  $K_{ATP}$ , utilizando conjuntamente antagonistas de estos canales, como el diazóxido.

### 1.7 Acción del diazóxido

Cabe señalar que el diazóxido es un derivado de las benzotiadiazidas cuyo mecanismo de acción se basa en la activación de los canales de  $K_{ATP}$ , lo que evita su cierre (efecto opuesto a las SU), por lo que se presenta una inhibición en la secreción de insulina, pero no un bloqueo de su síntesis y, al nivel del receptor de la insulina en los órganos diana que poseen  $K_{ATP}$ , inhibe la utilización periférica de la glucosa. En preparaciones de aislados de aorta de rata el diazóxido muestra un antagonismo no competitivo con sustancias similares a la noradrenalina, como la fenilefrina (Quast y Cook, 1989., Jones y col., 1997; Litter, 1998., Cyrino y col., 2003).

### 1.8 Acción de la fenilefrina y activación de los receptores $\alpha$ -adrenérgicos

Por su parte, la fenilefrina es un agonista de los receptores alfa adrenérgicos y por no ser un derivado del catecol no es inactivado por la catecol-O-metil transferasa (COMT), enzima que convierte el grupo  $OH$  en  $OCH_3$ , su tiempo de acción es mucho más prolongado que las catecolaminas (Lodish y col., 2002).

Los receptores alfa adrenérgicos al interactuar con la fenilefrina cambian su conformación y son capaces de acoplarse a proteínas  $G_q$  o  $G_i$ , respectivamente. Al acoplarse a  $G_i$  inhiben a la adenilato ciclasa mientras que, al acoplarse a  $G_q$  se estimula la fosfolipasa C, que a su vez genera inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El DAG, por ser una molécula lipofílica permanece en la membrana, mientras que el  $IP_3$  es capaz de difundir hacia el citosol y unirse a receptores de calcio sensibles a  $IP_3$  en el retículo endoplasmático. Su unión induce la apertura del canal lo que permite la salida de calcio hacia el citosol. El calcio liberado puede seguir dos caminos y provocar la migración de la proteína cinasa C hacia la membrana para ser activada por DAG y entonces fosforilar diversas enzimas y receptores celulares; o bien, unirse a la calmodulina, en general a cada molécula de calmodulina se unen 4 iones calcio, lo que provoca un cambio en la conformación de ésta, permitiendo su unión a muchas enzimas, tales como la cadena ligera de miosina, estimulando así la vasoconstricción (Lodish y col., 2002).

Por otro lado, aunque todos los hipoglucemiantes orales se emplean normalmente en el control de la DM2, con frecuencia se relacionan con efectos adversos importantes, como son: insuficiencia para responder de manera adecuada al tratamiento (tolerancia), coma diabético, acetonuria persistente, toxicidad fetal, entre otras. Por su parte, el tratamiento con insulina presenta ciertas complicaciones como: hipoglucemia, trastornos inmunitarios (alergia y/o resistencia inmunitaria a la insulina). También la vía de administración representa graves inconvenientes, ya que debido a las repetidas aplicaciones de inyecciones llegan a presentarse complicaciones, como irritación local y lipodistrofia en los sitios de inyección (Katzung, 1999). Cabe señalar que todos estos problemas con los fármacos hipoglucemiantes existentes hasta ahora, nos ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la DM, entre las que se encuentran las plantas medicinales.

### **1.9 Plantas medicinales**

En México el uso de plantas medicinales tiene un gran precedente histórico. Existen reportes que indican que países desarrollados, como en los Estados Unidos, el 20% de los sujetos diabéticos emplean la medicina herbolaria. Una de las plantas más empleadas en México por los pacientes con DM2 (73.1% de ellos) es el nopal *Opuntia streptacantha* (Argáez y col., 2003). Además, en investigaciones etnobotánicas se reporta la existencia de más de 300 plantas usadas en México como antidiabéticas (Hernández y col., 2002a; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Entre las familias botánicas más estudiadas científicamente en relación con su efecto hipoglucémico se encuentran: Cucurbitaceae y Asteraceae. Pertenecientes a estas familias se encuentran: *Cucurbita ficifolia* (**Figura 11**), *Ibervillea sonorae* (**Figura 13**), y *Psacalium peltatum* (**Figura 15**). A continuación se presenta una breve descripción de las características principales de cada una de estas especies

### 1.9.1 *Cucurbita ficifolia*



**Figura 11.** Fruto maduro de *Cucurbita ficifolia*

Familia: Cucurbitaceae

Nombre científico: *Cucurbita ficifolia* Bouché

Nombre común: Calabaza de hoja de higo (Estados Unidos), calabaza del malabar, sidra (Náhuatl), chilacayote (México y Guatemala), lacayote (Perú, Bolivia y Argentina), chiverri (Honduras y Costa Rica), victoria (Colombia).

#### a) Descripción botánica

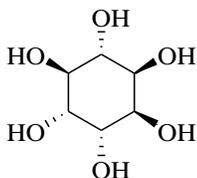
Planta perenne, resistente a las temperaturas extremas, excepto a la nieve. Ligeramente pubescente. Tiene cinco tallos angulares y hojas pecioladas. Con o sin manchas blancas en la superficie verde. Las flores masculinas son largas con un cáliz en forma de campana de 5-10 mm de largo y aproximadamente 5-15 mm de ancho, sépalos lineales y corola tubular en forma de campana, la cual es más ancha en la base de 6-12 cm. Las flores femeninas tienen pedúnculos fuertes de 3-5 cm de largo, su forma va de ovoide a elíptica, sépalos ocasionalmente foliáceos y una corola poco más grande que las flores masculinas. Fruta globosa, cuya forma va de ovoide a elíptica, el color va de verde claro a verde oscuro, con o sin líneas blancas longitudinales o rayas hacia el ápice, el endocarpio es dulce y las semillas son ovaladas de 7-12 mm de color castaño oscuro a negro.

#### b) Distribución geográfica

Estado de México, Puebla y Chiapas.

#### c) Componentes químicos

Andrade-Cetto y Heinrich (2005) reportan que *C. ficifolia* posee principalmente los siguientes compuestos: lecitinas en tallos y raíces. El 1.2% de la parte comestible es proteína, 1.7 mg calcio, 0.6 mg de hierro, 7 mg de ácido ascórbico y 0.03 mg de tiamina. Investigaciones recientes realizadas por Xia y Wang, 2006 demostraron que en el extracto acuoso de *C. ficifolia* se encuentra presente el compuesto D-qui-ro-inositol (**Figura 12**), mediador de los efectos de la insulina.



**Figura 12.** D-qui-ro inositol

#### d) Uso medicinal

Se emplea comúnmente en los platillos de la cocina mexicana, o como dulce. La infusión de las semillas se emplea para el control de la diabetes (<http://www.fao.org/docrep/T0646EOa.html> consultada Mayo, 2012).

#### 1.9.2 *Ibervillea sonorae*



Figura 13. Raíz de *Ibervillea sonorae*

Familia: Cucurbitaceae

Nombre científico: *Ibervillea sonorae* Green.

Nombre común: guareque, wereque, wareki, choya-huami.

#### a) Descripción botánica

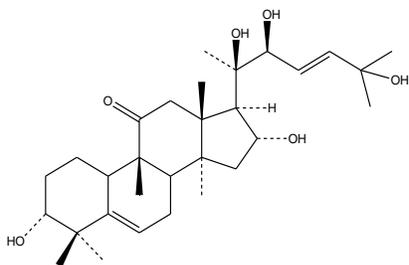
Adaptada a sobrevivir en ambientes áridos, posee tallos inflados, llamados acudes, que son los que se encargan de almacenar las reservas de agua y nutrientes. Puede permanecer inactiva durante muchos años, pero en épocas de lluvias las hojas surgen del acudes en los tallos superiores. Posee una raíz grande que se proyecta hacia la tierra, el cáliz tiene tres líneas cilíndricas. Ligeramente pubescente. Las flores ligeramente pedunculadas. Las semillas están cubiertas con una pulpa de color rojo, con excepción del margen que puede ser liso u oblongo.

#### b) Distribución geográfica

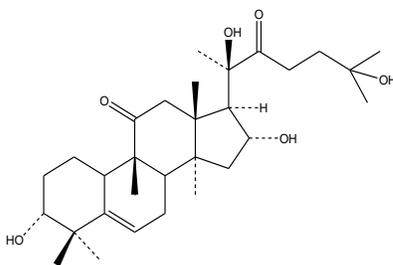
Culiacán, Chihuahua, Nuevo León, Sinaloa y Sonora.

#### c) Componentes químicos

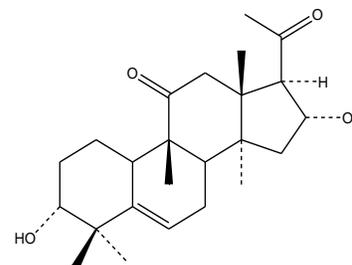
Se han descrito compuestos del tipo cucurbitano, glucósidos tipo cucurbitano, agliconas (kinoína A, B y C) y diversos monoglicéridos (Figura 14) y ácidos grasos (Achenbach y col., 1993; Hernández-Galicia y col., 2007).



Kinoína A



Kinoína B



Kinoína C

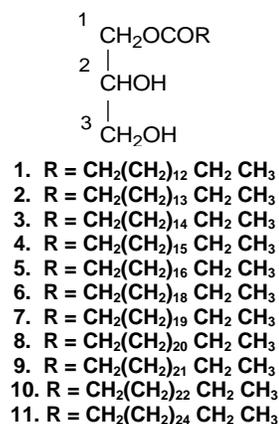


Figura 14. Kinoínas A, B y C (arriba) y monoglicéridos (abajo) encontrados en *I. sonorae*.

#### d) Uso medicinal

La infusión de las raíces se emplea para el control de la diabetes (<http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/wereque.pdf> consultada May, 2012).

#### 1.9.3 *Psacalium peltatum*

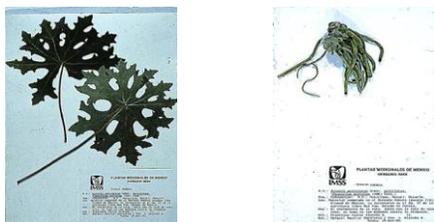


Figura 15. Ejemplares de herbario de las hojas y raíces de *Psacalium peltatum*

Familia: Compositae

Nombre científico: *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass.

Nombre común: Chongo de huare, Tipejtsikua nanakeri (purépecha), matarique.

#### a) Descripción botánica

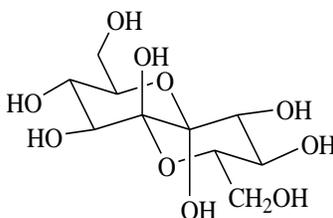
Planta herbácea perenne de 30 cm a 1.6 m de altura. Los tallos son casi leñosos, densamente pilosos en la base, pelos cafés. Las hojas basales son simples, alternas en roseta, de hasta 40 cm de largo, con el margen profundamente lobado, base peltada (de lámina redondeada y con el pecíolo inserto en el centro), con pecíolo largo. Las hojas subpeltadas (redondeadas), más pequeñas que las basales. La inflorescencia (forma en la que se encuentran las flores) posee de 10 a 24 flores, con prolongaciones de hasta 2 cm de largo, hojas que nacen de las prolongaciones (brácteas) pilosas y receptáculo plano. Las flores son hermafroditas, corola simpétala (pétalos unidos a una única rama), de color crema a café, estambres 5, ovario ínfero (que se desarrolla por debajo del cáliz). Los aquenios (fruto seco, cuyo pericarpio no se abre naturalmente para que salga su única semilla y no se encuentra unido a ella) son elipsoides, de 3 a 6 mm de largo. Posee un rizoma fibroso grueso.

## b) Distribución geográfica

Se encuentra en los estados de México, Jalisco, Puebla, Michoacán y Durango. Crece en los bosques de pino-encino, que se ubican entre los 205 a 1950 m sobre el nivel del mar, (<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/PsacaliumPeltatum> consultada May. 2012).

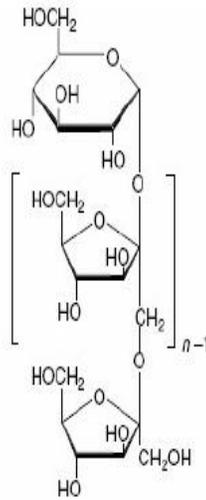
## c) Componentes químicos

Algunas especies también identificadas en la medicina tradicional mexicana como matarique han sido evaluadas farmacológicamente. De esta manera se encontró que el extracto metanólico de *P. radulifolium* produce efectos hipoglucémicos y antihiperoglucémicos. El aislamiento de los componentes de este extracto permitió identificar como compuestos mayoritarios a una serie de eremofilanoides: radulifolina D, radulifolina E, radulifolina F y *epi*-radulifolina F, cacalol, cacalona, maturina, maturinona, maturona, maturinina (Romo del Vivar, 1985; Garduño y Delgado, 2003). Este grupo de compuestos en forma aislada no presentaron el mismo efecto biológico que produjo el extracto completo. Contreras y *col.*, 2005, encontraron que el extracto acuoso de la planta previamente extraída con disolventes orgánicos también produce el efecto hipoglucémico. El componente mayoritario de este extracto fue la peltalosa (**Figura 16**, Alarcón Aguilar y *col.*, 2010).



**Figura 16.** Peltalosa

También se han identificado fructanos tipo inulina (Jiménez y *col.*, 2011). Los fructanos son polímeros de fructosa mucho más pequeños que los polímeros de glucosa del almidón, un carbohidrato no reductor. La mayoría contiene una unidad de glucosa terminal, lo cual indica que se originaron por la adición de unidades de fructosa, esta estructura puede ser lineal o ramificada y en menor grado cíclica (Wang y *col.*, 1999), no se metabolizan ni se fijan a proteínas plasmáticas, es decir, es un carbohidrato que no es digerible (Vijn y *col.*, 1999), llegando así al colon y sirviendo de sustrato para las bacterias colónicas, considerándose entonces como un prebiótico. Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que benéficamente afecta al hospedero, estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias en el colon (Gibson y *col.*, 1995). Se eliminan por vía renal y son un diurético que aumenta la excreción de agua y sodio. Existen cuatro grandes grupos de fructanos; levanos, fructanos (sin nombre) muy ramificados y otros poco ramificados y por último las inulinas (**Figura 17**).



**Figura 17.** Inulina ( $\beta$ -D-glucopiranosil)

Los levanos abundan en hojas y tallos, tienen una glucosa en el extremo inicial de la cadena. Algunos poseen ramificaciones, las cuales frecuentemente consisten en una sola unidad de fructosa. Los fructanos muy ramificados, son abundantes en los tallos de cebada y trigo, los cuales contienen tres o cuatro unidades de fructosa, mientras que sus inflorescencias presentan un grupo mucho mayor. Los fructanos sin ramificar se han identificado sólo en dos especies de la familia Liliaceae (cebolla y espárragos). Por otro lado, las inulinas se han identificado en las raíces de Asteráceas y Campanuláceas, contienen hasta 35 unidades de fructosa unidas entre sí en cadena lineal  $\beta$ -2,1 glicosídicos (el carbón 2 de una fructosa unido al carbón 1 de la anterior, también se han descrito pequeñas cantidades de enlaces  $\beta$ -2,6 en la cadena principal y ramificaciones. Cada inulina contiene glucosa en el extremo inicial de la cadena (Salisbury y Ross, 1994, Bucay, 2008).

#### **d) Uso medicinal**

El té de la raíz se emplea para el control de la diabetes y dolores reumáticos (<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/PsacaliumPeltatum.html> consultada Mayo, 2012)

### **1.10 Estreptozotocina**

La estreptozotocina es un fármaco altamente utilizado para inducir diabetes experimental y es empleado como modelo útil para el estudio de la actividad hipoglucemiante de plantas medicinales. La estreptozotocina entra a las células  $\beta$  del páncreas a través de GLUT2, provocando la adición de un grupo alquilo (alquilación) al ADN, activando la poli-ribosilación de ADP. Este proceso es más importante para la diabetogenicidad de la estreptozotocina que el daño al ADN. La poli-ribosilación lleva a la disminución del NAD<sup>+</sup> celular y del ATP. El incremento en la desfosforilación del ATP después del tratamiento con estreptozotocina proporciona un sustrato

para la xantina oxidasa, resultando en la formación de radicales superóxido. Como consecuencia de esto, también se generan peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Además, la estreptozotocina libera cantidades tóxicas de óxido nítrico, el cual inhibe la actividad de la aconitasa y participa en el daño al ADN. Como resultado de esta acción, la célula  $\beta$  pancreática sufre destrucción principalmente por apoptosis (Murata y *col.*, 1999). Así, la estreptozotocina es un potente agente alquilante del ADN que actúa como donador de óxido nítrico (NO) en las células  $\beta$  pancreáticas, por ser particularmente sensibles al daño por el NO y otros radicales libres a causa de sus bajos niveles de enzimas atrapadoras de radicales libres (Szkudelski, 2001).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La actividad hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora* y *Psacalium peltatum* ha quedado demostrado en estudios previos en diferentes modelos experimentales (Chattopadhyay, 1999; Acosta y col., 2001; Alarcón y col., 2002a ,b y c; Hernández y col., 2002a y b, 2006; Román y col., 1992; Alarcón y col., 1997; Contreras y col., 2002 a) y se han asociado sus compuestos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citotóxicas, representando una alternativa viable en el control de la DM2. Sin embargo, no se ha estudiado la influencia de estas especies vegetales en la concentración de insulina, así como su efecto sobre los canales  $K_{ATP}$ , actividad antioxidante y antiinflamatoria y su efecto sobre la actividad de algunas enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa.

Estudios fitoquímicos recientes, realizados en el laboratorio de Farmacología de la UAM-I, han mostrado que los extractos hipoglucemiantes de estas plantas contienen alcaloides, saponinas, ácidos grasos, carbohidratos y esteroides, los cuales han sido asociados con actividades antioxidantes; por otro lado, se ha reportado que *Psacalium sp* posee actividad antiinflamatoria y citotóxica (Hernández y col., 2005 y 2006; Contreras y col., 2005). Debido a que en previos estudios se ha mostrado la utilidad de los antioxidantes en la prevención y control de la DM2 (Ruhe y MacDonald, 2001) es importante estudiar la actividad antioxidante, el efecto de estas plantas sobre el contenido de glutatión, malondialdehído y los marcadores inflamatorios, tales como  $TNF\alpha$ , IL6 y resistina, así como sobre la adipocina antiinflamatoria adiponectina (**Tabla 1**) en animales con diabetes experimental, ya que se sabe que dichos marcadores se modifican en la DM2. Para poder explicar las propiedades benéficas de los extractos de las plantas seleccionadas para el presente estudio, en el control de la DM2, es especialmente importante evaluar su efecto sobre la concentración de insulina en ratones con diabetes experimental y sobre los canales de  $K_{ATP}$ , así como determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de las tres especies vegetales, y su efecto sobre la actividad de enzimas que regulan la homeostasis de la glucosa.

Considerando que: 1) la DM2 es una de las primeras causas de mortalidad en México, 2) la demanda por nuevos tratamientos incrementa día a día, 3) se desconoce la influencia de las plantas hipoglucemiantes sobre la concentración de insulina plasmática en pacientes con DM2 y en animales con diabetes experimental, 4) en los pacientes con DM2 se incrementa la generación de radicales libres, 5) en la DM2 se presenta un proceso inflamatorio persistente de baja intensidad, y 6) tampoco se conoce el efecto de estas plantas sobre la actividad de enzimas que regulan la homeostasis de la glucosa.

Esta investigación representaría el comienzo para esclarecer cuáles son los efectos de estas plantas sobre los parámetros anteriormente mencionados, sentando las bases para nuevas investigaciones clínicas que permitan el desarrollo de fitofármacos o medicamentos para el control de la DM2. Además, esta investigación sería una contribución al conocimiento de alternativas validadas experimentalmente en el control de la DM y de sus complicaciones lo cual, a su vez, podría motivar el cultivo, preservación y mejoramiento de dichas especies.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el mecanismo de acción hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora* y *Psacalium peltatum*, así como estudiar su actividad enzimática, antioxidante y antiinflamatoria.

#### **3.1.1 Objetivos particulares**

1. Obtener y caracterizar químicamente los extractos hipoglucemiantes de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora* y *Psacalium peltatum* con base en el contenido de sus constituyentes principales.
2. Demostrar que el efecto hipoglucémico de las tres plantas es el resultado del incremento en los niveles de insulina.
3. Determinar la posible participación de los canales de  $K_{ATP}$  en la acción hipoglucemiante mediada por la insulina.
4. Determinar si en la acción hipoglucemiante de las tres plantas participan enzimas clave del metabolismo de carbohidratos (lactato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfatasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa).
5. Estudiar la posible actividad hipolipemiante, antioxidante y antiinflamatoria de las tres plantas en ratones con diabetes experimental.

#### **4. HIPÓTESIS**

La acción hipoglucemiante de los extractos activos de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora* y *Psacalium peltatum* está mediada por la insulina, a través del bloqueo de los canales de  $K_{ATP}$ , y/o la activación de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. Dicha acción está acompañada de efectos antioxidantes y antiinflamatorios que representan beneficios adicionales para el control de la DM.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal fue colectado en el campo y se obtuvieron extractos empleando disolventes de diferente polaridad. Los extractos secos se administraron a ratones sanos y diabéticos durante 30 días; la influencia de éstos sobre la concentración de insulina, adiponectina y resistina fue evaluada mediante una prueba de ELISA (Linco); lo mismo para IL-6 y TNF-alfa (BD Biosciences). El efecto bloqueador de los extractos sobre los canales  $K_{ATP}$  se realizó empleando un equipo BIOPAC, utilizando segmentos de aorta torácica de rata macho y se indujo la contracción y relajación del tejido empleando agonistas alfa adrenérgicos ( $1 \times 10^{-5}$  M) y de canales  $K_{ATP}$  ( $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M). Se hicieron determinaciones del peso corporal, consumo de agua y alimento durante el estudio. La evaluación del efecto de los extractos sobre las enzimas del metabolismo de los carbohidratos se llevó a cabo en hígado y riñón de ratones sanos y diabéticos tratados durante 30 días con los extractos. El contenido de malondialdehído fue medido a través de una sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico, también se determinó el contenido de glutatión (GSH) en hígado, corazón, riñón y páncreas por un método colorimétrico. Los triglicéridos fueron evaluados en sangre mediante un equipo Reflotrón.

El análisis de los resultados se realizó mediante un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, empleando el programa NCSS, utilizando un nivel de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ).

### 5.1 Material vegetal

Los frutos de *Cucurbita ficifolia* fueron colectados en Av. Del Trabajo No. 13 San. Bartolo Chico, Acolman, Estado de México en octubre de 2006. Los tubérculos de *Ibervillea sonorae* se colectaron en el poblado de Carbó, en el estado de Sonora, el 3 de Abril de 2007. Las raíces de *Psacalium peltatum* se colectaron en el Municipio Mineral del Chico. Loc. Barrio La Estancuela. Pachuca, Hidalgo, el 18 de Mayo de 2007. La identificación botánica se realizó mediante el cotejo con ejemplares de herbario de los herbarios IMSSM (Voucher espécimen Núm. 11119 para *C. ficifolia* y 14184 para *I. sonorae*, 11490 para *P. peltatum*)

#### 5.1.1 Obtención de los extractos

Se pesaron las partes usadas de cada especie vegetal. En el caso de *Cucurbita ficifolia* se utilizó el endocarpio del fruto libre de semillas. Para *Ibervillea sonorae* y *Psacalium peltatum* se emplearon las raíces.

Enseguida se realizó el secado del material vegetal seleccionado sobre una superficie plana bajo condiciones de oscuridad y aeración constante. Se usó un molino eléctrico tipo 4 Wiley, con una malla de 1 mm para reducir el tamaño de partícula.

El peso de los frutos maduros de *Cucurbita ficifolia* fue de 18.5 Kg. Con el objetivo de obtener las preparaciones que se emplean comúnmente, se cortó por la mitad un fruto, eliminando la parte central (500 mg) se dejó macerando durante 24 h con 2 L de agua, la cual fue eliminada por liofilización, obteniéndose finalmente un rendimiento del 4%, y 250 g fueron sometidos a ebullición en 2 L de agua, obteniéndose un rendimiento de 24.1%. El resto del material colectado,

seco y molido pesó 800 g y se maceró en matraces Erlenmeyer durante 24 h por tres días a temperatura ambiente, con aeración constante con disolventes de polaridad ascendente (*n*-hexano, para eliminar ceras y clorofilas de baja polaridad). El residuo vegetal fue nuevamente empleado para posteriores procesos de extracción con diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y metanol.

El peso de los tubérculos de *Ibervillea sonora* fue de 18.5 Kg; el peso del material vegetal seco y molido fue de 4 Kg. El material vegetal seco y molido (500 g) se extrajo a reflujo durante 1 h con 1000 mL de agua destilada, la cual fue evaporada por liofilización; el rendimiento se muestra en la **Tabla 5**.

El peso de las raíces de *Psacalium peltatum* fue de 3 Kg; el material vegetal seco y molido fue de 561 g y 180 g fueron sometidos a extracciones continuas usando un equipo Soxhlet el cual contenía 2400 mL de disolventes de polaridad ascendente (Hx, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH). El material vegetal fue finalmente extraído por reflujo con H<sub>2</sub>O. El extracto acuoso fue separado en dos fases, una acuosa y un precipitado mediante centrifugación a 1000 x *g* durante 5 min; finalmente ambos extractos fueron sometidos a liofilización.

**Tabla 5.** Rendimientos expresados en porcentaje en relación al peso seco obtenidos de los diferentes extractos.

Extracto	Hexano	Diclorometano	Metanol	Agua
<i>Cucurbita ficifolia</i>	10.2	8.3	12.9	35
•maceración	nr	nr	nr	4
•ebullición	nr	nr	nr	24.1
<i>Ibervillea sonora</i>	nr	nr	nr	37.4
<i>Psacalium peltatum</i>	12.4	7.2	15.4	35p

\*p= precipitado

\*nr=no se realizo

### 5.1.2 Estandarización de los extractos

#### a) *Cucurbita ficifolia*

Existe suficiente evidencia experimental y clínica que demuestran su efecto hipoglucémico y también se ha encontrado que la parte comestible contiene principalmente: fibra, proteínas, calcio, hierro, ácido ascórbico, tiamina (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) y *D*-quiro inositol (9 Xia y Wang, 2006). Este último compuesto es un mediador de los efectos de la insulina, por lo tanto, se decidió utilizar este ciclo hexano hexahidroxilado para estandarizar el extracto acuoso.

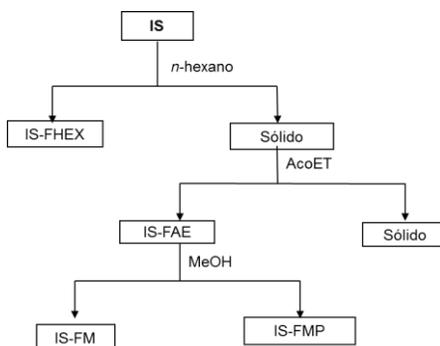
Para esto, se realizó un análisis por HPLC, empleando un sistema cromatográfico provisto de un módulo de separación Waters 2695 y un detector de índice de refracción Waters 2697 (Waters; Milford, MA, USA). Se empleó una columna Lichrospher NH2 5µm 250x4 mm, 100 Å. El sistema de elusión fue CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 80:20, con un flujo de 1mL/min, durante 10 min. Cuatro concentraciones ascendentes del estándar de DQI (50, 100, 200 and 400 mg/mL, en 20 µL) fueron inyectados por duplicado bajo las mismas condiciones del sistema HPLC. El DQI mostró un tiempo de retención de 8.6 min, presentando un coeficiente de correlación de 0.93. La inyección del

macerado (20  $\mu$ L, 4 mg) corresponde a 0.75 mg de DQI/g de extracto; mientras que la inyección del macerado (20  $\mu$ L, 2 mg), corresponde a 3.7 mg de DQI/g de extracto.

**b) *Ibervillea sonora***

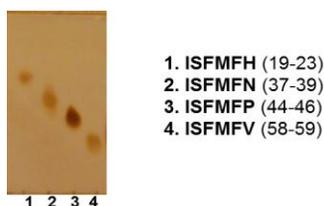
Considerando que el extracto diclorometánico de *Ibervillea sonora* induce un efecto hipoglucémico en ratones sanos y con diabetes moderada (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) y que dicho extracto contiene principalmente: cucurbitanos, glucósidos de cucurbitanos (kinoína A, B y C, **Figura 14**) (Achenbach y col., 1993), se emplearon dos de estos cucurbitanos glucosilados como marcadores para esta planta.

A partir de 45 g del extracto acuoso de *Ibervillea sonora* se obtuvieron 5.7 g de la fracción IS-FM, empleando disolventes de polaridad ascendente (*n*-hexano, acetato de etilo y metanol (**Figura 18**).



**Figura 18.** Método de obtención de la fracción IS-FM.

A continuación, 3.4098 g de la fracción de IS-FM fueron separados mediante cromatografía en columna abierta (sílica gel 60), empleando un sistema de elusión comenzando por  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$  95:5 a 85:15. Las fracciones obtenidas fueron agrupadas mediante afinidad cromatográfica en placas de fase normal con un sistema de elusión  $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN}$  7:2:1, empleando como revelador sulfato sérico (**Figura 19**) y las fracciones 44 a 46 se designaron como ISFMFP, obteniéndose 123.5 g y las fracciones 58 a 59 fueron designadas como ISFMFV y se obtuvieron 115.4 mg.



**Figura 19.** Comparación cromatográfica de las fracciones obtenidas de *I. sonora*.

Las fracciones anteriores fueron analizadas en el mismo sistema de HPLC anteriormente descrito, con el siguiente sistema de elusión;  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (70:30), empleando una columna

Lichrosphere 125 X 4 mm 100Å RP-18 5µm. Las fracciones ISFMFP e ISFMFV fueron empleadas como estándares y fueron inyectadas por duplicado (50, 100, 200, 400 y 800 µg/mL, en 20 µL) en el mismo sistema HPLC con un detector de arreglo de diodos Waters 2996. ISFMFP mostró un tiempo de retención de 2.2 y 3.7 min para ISFMFV, presentando un coeficiente de correlación de 0.96 y 0.95. La identificación estructural de los compuestos contenidos en ambas fracciones fue realizada por <sup>13</sup>C RMN y las señales espectroscópicas fueron comparadas con las descritas anteriormente (Achencbach y col., 1993). La inyección de las fracciones (20 µL, 4 mg) corresponde a 50.5 y 79.1 mg del compuesto 1 y 2/g de extracto, respectivamente.

**c) *Psacalium peltatum***

En esta especie también el extracto acuoso es el responsable del efecto hipoglucémico (Conteras, 2002a). Aunque los extractos de menor polaridad contienen principalmente: cacalol, cacalona, maturina, maturinona, maturona y maturinina (Romo del Vivar, 1985), estos compuestos en forma pura no producen el efecto esperado (Alarcón y col., 2000). Por otro lado, la peltalosa (**Figura 16**, Contreras y col., 2005) es uno de los compuestos mayoritarios en el extracto acuoso de *P. peltatum*, y se detectó la presencia de este compuesto, así como otro encontrado en el extracto de *n*-hexano (eremofilano) y un glucopiranosil (inulina), que son compuestos abundantes en esta especie vegetal.

De acuerdo a la estructura química de la peltalosa este es un compuesto altamente polar, por lo que para facilitar su identificación se realizó la acetilación del precipitado del extracto acuoso y se llevó a cabo a partir de un gramo de éste, tratado con 4 mL de Ac<sub>2</sub>O/piridina (2:1). La mezcla fue sometida a agitación durante 24 h a temperatura ambiente; la reacción fue monitoreada mediante cromatografía de capa fina (TLC). Posteriormente se agregó agua (10 mL) al producto de reacción y se extrajo con acetato de etilo, el cual rindió un grupo de compuestos per-acetilados constituidos por fructanos octa-per-acetilados y la glucopiranososa penta-acetilada. El producto de esta reacción (0.1 g) fue separado cromatográficamente en una columna abierta (sílica gel 60 y el sistema de elusión fue CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH en gradiente). La identificación de los carbohidratos acetilados fue realizada mediante comparación de los datos espectroscópicos de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>HRMN, previamente reportados (Contreras- y col., 2005).

Se observó la formación de un precipitado de color naranja-rojo en el extracto de *n*-hexano, el cual fue lavado con CHCl<sub>3</sub> y posteriormente el residuo sólido se disolvió con MeOH y finalmente se disolvió nuevamente en *n*-hexano. Este último (PpHx3), fue analizado mediante HPLC, empleando un módulo de separación Waters 2695 y un detector de arreglo de diodos Waters 2996 con el siguiente sistema de elusión; CH<sub>3</sub>CN/MeOH 1:1/H<sub>2</sub>O TFA 0.5% en gradiente, comenzando por 90:10 a 10:90, empleando una columna Alltima HP C-18 53 X 7 mm 3 µm. PpHx3 fue empleado como estándar y fueron inyectados 20 µL por duplicado, a las siguientes concentraciones 25, 50, 100 y 200 µg/mL, el PpHx3 presentó un tiempo de retención de 35.56 min y un coeficiente de correlación de 0.99. Posteriormente PpHx3, fue analizado mediante RMN, para dilucidar su estructura preliminar.

Se realizó una hidrólisis ácida para separar los carbohidratos; 40 g del precipitado del extracto acuoso de *P. peltatum*, fueron tratados con 5 mL de HCl 2M, a 50°C durante 2 h. Después se enfrió a temperatura ambiente y el producto de reacción fue neutralizado con  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_2$  y liofilizado. Los azúcares obtenidos fueron analizados por TLC ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ; 75:25).

El análisis mediante HPLC se realizó comparando con los estándares de carbohidratos: sacarosa, glucosa y fructosa. Los azúcares se analizaron en HPLC empleando un módulo de separación Waters 2695 y un detector de índice de refracción Waters 2697 (Waters; Milford, MA, USA). Se empleó una columna Lichrosphere  $\text{NH}_2$  5  $\mu\text{m}$  250 x 4 mm, 100 Å. El sistema elusión fue  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (90:10), con un flujo de 1 mL/min, durante 10 min. Seis concentraciones de los estándares de carbohidratos (25, 50, 100, 200, 500 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en 20  $\mu\text{L}$ ) fueron inyectados por duplicado bajo las mismas condiciones del sistema HPLC. La fructosa mostró el mayor tiempo de retención que fue de 6.7 min, presentando un coeficiente de correlación de 1. La inyección del producto de hidrólisis del precipitado del extracto acuoso de *P. peltatum* (20  $\mu\text{L}$ , con 2 mg /mL) corresponde a 223.16 mg de fructosa/g del producto de hidrólisis.

### **5.1.3** Diseño experimental

#### **5.1.3.1** Animales de experimentación

Los animales de experimentación fueron ratones sanos (cepa CD-1) machos, adultos, de 25 a 35 g de peso; alimentados con nutriente Harlan y agua a saciedad. Se formaron 2 grupos de animales para el estudio. El primer grupo (Normal), animales normoglucémicos a los cuales se les administró solución salina isotónica. El segundo grupo (STZ) fueron animales con diabetes experimental, la cual fue inducida mediante la administración de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal (136.5 mg/kg). Se considero que se indujo diabetes experimental a aquellos animales que presentaron niveles de glucosa sanguínea entre 200 y 350 mg/dL después de 8 días de la administración del agente diabetógeno. Este grupo fue dividido en 5 subgrupos de 10 animales cada uno (Control, *C. ficifolia*, *I. sonorae*, *P. peltatum* y pioglitazona (como control positivo). Al grupo Control se le administró buffer de citratos, empleado como disolvente el agente diabetógeno). Los extractos se administraron diariamente a ratones con diabetes experimental a dosis de 250 mg/kg. Para la evaluación enzimática, concentración de insulina, triglicéridos, contenido de malondialdehído, GSH, citocinas pro y antiinflamatorias los extractos se administraron durante 30 días consecutivos a ratones sanos y con diabetes inducida por STZ. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia profunda en el día 31 después de haber comenzado el tratamiento. Se colectó sangre por el seno orbital del ojo y se manipulo de acuerdo a los fabricantes de los equipos para la medición de los marcadores de inflamación evaluados y se extrajo el páncreas, riñón, corazón e hígado, y se lavaron con solución salina, se almacenaron para posteriormente realizar las determinaciones enzimáticas y de estrés oxidante.

### 5.1.3.2 Efecto de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* en la concentración de glucosa, insulina, triglicéridos y citocinas

Después de los tratamientos, se extrajo una muestra sanguínea del seno orbital del ojo de los ratones, accediendo a éste a través de los márgenes del ojo. La sangre fue colectada en tubos Eppendorf y se manejó conforme a las especificaciones del fabricante del equipo empleado, de acuerdo con cada una de las determinaciones realizadas. Para la determinación de glucosa se empleó un equipo Acutrend Sensor Roche. La cuantificación de la concentración de insulina en suero y de adiponectina, resistina, TNF $\alpha$ , IL6 plasmáticas se utilizó el método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, rata/ratón, Linco y BD Bioscience). El contenido de triglicéridos se determinó en una muestra sanguínea, utilizando un equipo Reflotrón.

### 5.1.3.3 Evaluación del potencial bloqueador de los extractos sobre los canales $K_{ATP}$

El modelo propuesto consistió en inducir mediante fenilefrina la contracción en los tejidos incubados con vehículo, glibenclamida o con los extractos de las plantas bajo estudio. Esta contracción en los tejidos incubados con DMSO fue inhibida por acción del diazóxido, que es un activador de los canales de  $K_{ATP}$ . Mientras que en los tejidos que fueron incubados con glibenclamida se induce un promedio de contracción menor al registrado por DMSO., debido a que la glibenclamida se une a los receptores (SUR) y evita que el diazóxido abra los canales de potasio.

Para estos estudios se emplearon ratas sanas, macho, de la cepa Wistar, de 250-300g de peso corporal, las cuales fueron sacrificadas por anestesia profunda con pentobarbital (92.5 mg/kg); inmediatamente se extrajo la aorta torácica y se colocó en una solución Ringer Krebs Bicarbonato (RKB), cuya composición es: NaCl 120 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KCl 4.7 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM y glucosa 11 mM, pH de 7.2-7.4. Se cortó la aorta torácica en 4 anillos tomados de la parte central y se colocaron en un baño de 5 mL de RKB. La actividad contráctil se registro a través de un transductor (tensión ajustada a 2 g) en un Biopac. Se lavaron los tejidos cada 15 min con la solución RKB y permanecieron burbujeando con una mezcla de 95% de O<sub>2</sub> y el 5% de CO<sub>2</sub> durante una hora para estabilizar la respuesta.

Enseguida se probó la viabilidad del tejido, induciendo la despolarización de la membrana con una solución de RKB  $K_{60mM}$  cuya composición es idéntica a RKB, excepto por: NaCl 64.7 mM y KCl 60 mM y se emplearon los tejidos con 96-100% de respuesta contráctil. Posteriormente éstos se lavaron para que regresaran a su estado basal.

A los tejidos se les agregó fenilefrina  $3.2 \times 10^{-7}$  M en el baño para inducir una contracción sostenida (respuesta en forma de meseta) y posteriormente se adicionaron dosis acumulativas de diazóxido ( $1 \times 10^{-5}$  –  $1 \times 10^{-4}$  M), en incrementos logarítmicos para inducir la relajación del tejido. A continuación los tejidos se lavaron durante 30 min aproximadamente para restaurar los valores basales. Se adicionaron los extractos de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae* y *Psacalium peltatum* –a diferentes concentraciones- (1, 3, 10, 30  $\mu$ g/mL), glibenclamida ( $1 \times 10^{-5}$  M) o el vehículo (DMSO/etanol), y se incubaron durante 30 min.

El efecto inducido por el diazóxido se expresó como el porcentaje de la inhibición inducida por fenilefrina  $3.2 \times 10^{-7}$  M.

#### **5.1.3.4** Estimación de la actividad de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos

Después de los tratamientos, los ratones fueron sacrificados con pentobarbital/agua 50:50. Se extrajo el hígado, corazón, riñón y páncreas, los tejidos se lavaron con solución salina, y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

##### **a)** Lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la conversión de lactato a piruvato con la simultánea reducción de NAD a NADH. El hígado (0.5 g) se homogeneizó con 0.9 mL de un amortiguador de PBS 0.1 M, pH 7.0 y se centrifugó a  $15\,000 \times g$ , durante 30 min, a  $4^{\circ}\text{C}$ . En el sobrenadante se determinó la actividad de la LDH. A 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fueron agregados 260  $\mu\text{L}$  de piruvato de sodio (23 mM), 0.05 mL de NADH (12 mM) y la solución fue mezclada suavemente. Se midió la absorbancia a 340 nm. La actividad enzimática se expresó como U (unidad)/mg de proteína/min (Boehringer Mannheim, 1965).

##### **b)** Glucosa 6-fosfatasa

Esta enzima cataliza la conversión de G6F a glucosa. El hígado (250 mg) fue homogenizado en un Polytron (PT 1200 CL), con 9.75 mL del buffer de citrato de sodio 0.1M, pH 6.5, y fue filtrado a través de una gasa. La determinación de la enzima fue realizada como lo describe Bergmeyer (1965). El tejido homogenizado (0.1 mL) fue incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 5 min y entonces se mezcló con 0.1 mL de glucosa-6-fosfato (0.08 M) disuelto en el buffer de citrato de sodio. La reacción se realizó a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 15 min; posteriormente se agregaron 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) (10% peso/volumen) y se centrifugó a  $20,000 \times g$  por 5 min. El contenido de fosfato en el sobrenadante fue determinado por un método colorimétrico; 1 mL del sobrenadante se mezcló con 5 mL de molibdato de amonio 0.002 M y se agregó 1 mL de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico 0.042 M. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y la mezcla se leyó a 660 nm. Una muestra contenía únicamente el reactivo, el cual fue usado como control. El contenido de proteína en hígado se determinó por el método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad enzimática fue expresada como U/mg de proteína/min.

##### **c)** Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

El hígado fue homogenizado (0.1 g) con 1 mL de buffer de trietanolamina, pH 7.6, y fue centrifugado  $12,000 \text{ rpm}$  ( $129 \times g$ ) durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante (10  $\mu\text{L}$ ) fue adicionado a la mezcla de reacción que contenía: buffer de trietanolamina 86.3 mM, pH 7.6,  $\text{MgCl}_2$  6.7 mM, glucosa-6-phosphato 1.2 mM y  $\text{NADP}^+$  10 mg/mL. Todo fue mezclado y leído a 340 nm cada minuto, durante 5 min, (Boehringer Mannheim, 1965). La actividad de la enzima fue expresada como U/mg de proteína/min.

#### **5.1.3.5 Efecto de los extractos sobre el contenido de glutatión reducido y malondialdehído**

Se emplearon ocho animales de cada grupo y fueron sacrificados con pentobarbital/agua 50:50. Se extrajo el hígado, corazón, riñón y páncreas y se lavaron con solución salina, entonces los tejidos se emplearon para determinar el contenido de glutatión y malondialdehído, a través de mediciones con ácido nitrobenzóico (DTNB) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), respectivamente.

##### **a) Determinación de glutatión reducido (GSH)**

Previo al estudio se realizó una curva estándar de glutatión, las muestras se procesaron de la manera siguiente: por cada tejido se tomó una alícuota de 0.1 g, se homogenizó en un Polytrón (PT 1200 CL) con 1 ml de ácido metafosfórico, se dejó reposar en hielo durante 15 min, posteriormente se centrifugó a 9,000 x g, durante 10 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.3 ml, se agregó 0.7 ml del ácido metafosfórico y se mezcló; enseguida se adicionaron 2 ml de buffer TRIS, se hidrató el DTNB con alcohol metílico y se agregaron 50 µL a cada tubo, se agitaron todos los tubos y se observó un cambio de color de incoloro a amarillo; se dejó reposar durante 5 min y, por último, las muestras fueron centrifugadas (1000 x g) para eliminar la turbidez. Se leyeron las absorbancias a 412 nm.

##### **b) Determinación de malondialdehído (MDA)**

Las muestras de los tejidos (0.1 g) se homogenizaron con 1 mL de ácido metafosfórico, del homogenizado se tomaron 300 µL y se colocaron en tubos con rosca; a éstos se les adicionaron 200 µL de agua para obtener un volumen de 500 µL; posteriormente se agregó la mezcla de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico)-HCL y los tubos se calentaron a baño María durante 15 min. Después se dejaron enfriar y fueron centrifugados a 100 x g. Se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 535 nm. Se utilizó un blanco de lectura que contenía 500 µL de ácido metafosfórico más la mezcla de reactivos para ser sometidos al mismo procedimiento que los otros tubos.

## **6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se calculó la media  $\pm$  la desviación estándar en los estudios. En los estudios *in vitro* con los anillos de aorta, se calculó la respuesta máxima obtenida por los tratamientos aplicados. El efecto inducido por el diazóxido se graficó y expresó como el porcentaje de inhibición de la contracción inducida por fenilefrina  $3.2 \times 10^{-7}$  M. En todos los casos las diferencias se establecieron mediante un análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Los resultados con un valor de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

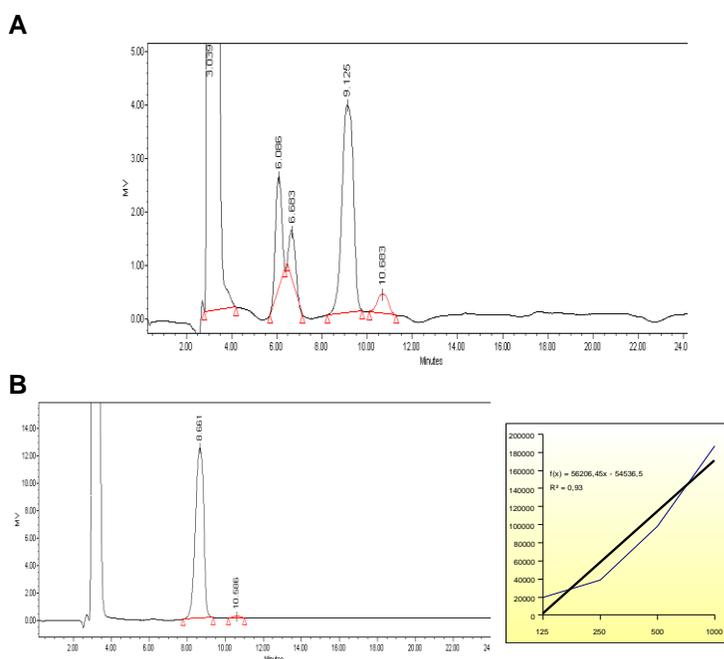
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estandarización de los Extractos

Esto se realizó con el objetivo de conocer los compuestos presentes en los extractos vegetales bajo estudio y además conocer la concentración de estos mismos.

#### a) *Cucurbita ficifolia*

El cromatograma correspondiente a DQI identificado en el extracto acuoso de *C. ficifolia* se muestra en la **Figura 20** panel **A**. Se observan varios picos: el primero corresponde al frente del disolvente y el pico mayoritario corresponde al DQI; en **B** se presentan tanto el cromatograma correspondiente al estándar del DQI analizado en HPLC, así como la curva de calibración (concentración del estándar DQI contra absorbancia) y, a partir de ésta, se calculó la concentración de DQI presente tanto en la preparación tradicional como en el extracto acuoso de *C. ficifolia*.



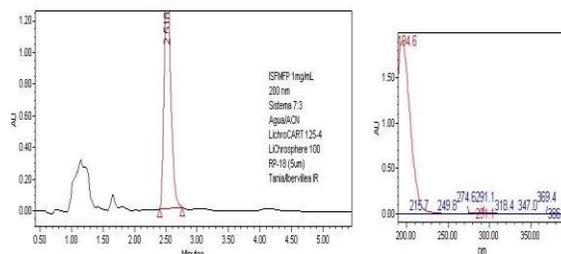
**Figura 20. A** Cromatograma obtenido para el extracto acuoso de *C. ficifolia*.  
**B** cromatograma y curva de calibración de DQI

#### b) *Ibervillea sonorae*

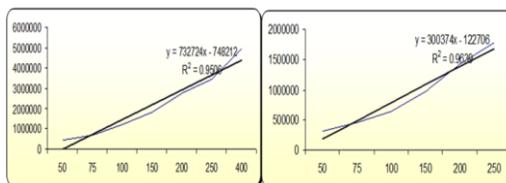
El cromatograma obtenido del análisis de HPLC para la fracción ISFMFP se muestra en **Figura 21** panel **A** (izquierda). Se observa un pico mayoritario que aparece en el minuto 2.5 y en la derecha se encuentra el espectro correspondiente al pico señalado. Esta longitud de onda es característica de compuestos terpénicos. En el panel B se muestran las curvas de calibración obtenidas para las fracciones ISFMFP e ISFMFV, las cuales se emplearon para calcular la concentración de ambos compuestos en el extracto acuoso de *I. sonorae* (**Tabla 6**). El análisis de RMN dio como resultado las señales que se muestran en la **Tabla 7**, y mediante la comparación de éstas con los datos previamente reportados por Achenbach (1993) fue posible establecer la

identidad de estos compuestos, los cuales se ilustran en la **Figura 22**. El compuesto es ((2*S*)-3 $\alpha$ -( $\beta$ -D-Glucopiranosiloxil)-16 $\alpha$ ,20,22,25-tetrahidroxil-(10 $\alpha$ )-cucurbita-5,23*t*-dien-11-ona), **1** y el compuesto es 16 $\alpha$ ,20,25-Trihidroxi-3 $\alpha$ -(2-O- $\alpha$ -L-rhamnopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosiloxil)-(10 $\alpha$ )-cucurbita-5-ene-11,22-diona **2** (**Figura 22**).

**A**



**B**



**Figura 21.** A Cromatograma y espectro de absorción correspondiente a la fracción ISFMFP de *I. sonorae*, **B**, curvas de calibración para las fracciones ISFMFP e ISFMFV.

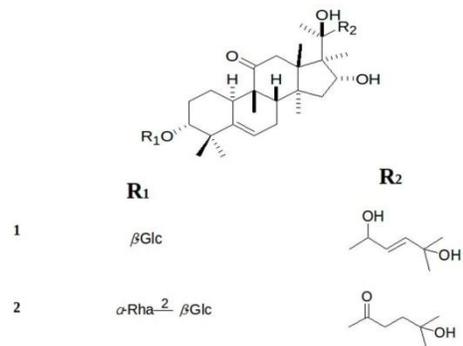
**Tabla 6.** Concentración de los cucurbitanos glucosilados en *I. sonorae*

Extracto	Compuesto 1 y 2 (mg/g) de extracto
Acuoso	50.5 ISFMFP (1) 79.1 ISFMFV (2)
IS-FHEX	nd
IS-FAE	nd
IS-FM	nd
IS-FMP	nd

\*nd: no se detectó

**Tabla 7.** Desplazamiento químico RMN <sup>13</sup>C de dos fracciones del extracto acuoso de *I. sonorae*

ISFMFP		ISFMFV	
18.37	61.38	18.55	47.85
19.79	69.11	19.06	48.50
21.69	70.36	20.30	50.48
22.69	73.57	21.98	69.06
22.96	75.35	25.09	70.78
23.65	76.69	26.67	78.60
24.69	77.01	29.45	79.63
30.17	78.27	29.69	80.39
30.27	81.51	32.54	99.46
34.41	100.48	38.66	142.13
41.32	117.68	39.09	186.47
41.31	124.85	39.51	
47.95	139.69	39.92	
49.11	142.09	40.34	
50.67	213.39	40.76	
55.18		41.47	



**Figura 22.** Estructuras químicas de los cucurbitanos glucosilados presentes en el extracto acuoso de *I. sonorae*.

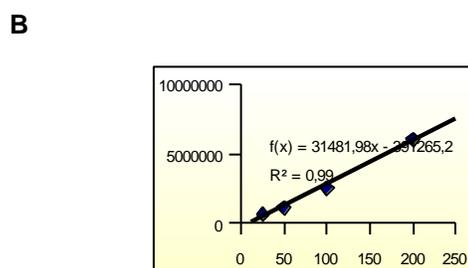
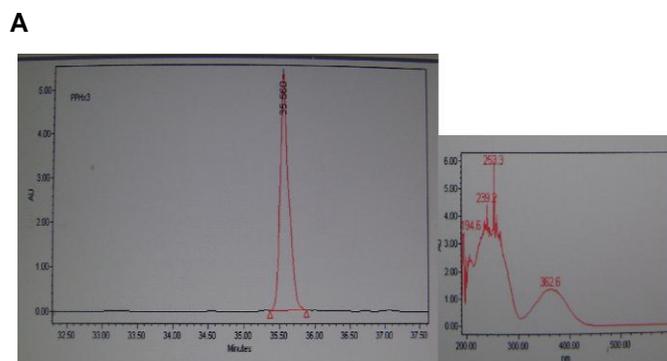
**c) *Psacalium peltatum***

La acetilación del precipitado del extracto acuoso de *P. peltatum* produjo la peltalosa peracetilada reportada por Contreras y col., 2005 (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Señales espectroscópicas para el producto de acetilación del precipitado del extracto acuoso de *P. peltatum*.

Desplazamiento químico RMN $^{13}\text{C}$			
Peltalosa peracetilada (Contreras-Weber y cols., 2005)	Grupo funcional	PpA-FMP acetilado 200MHz	PpA-FMP acetilado 500MHz
20.39	OCOCH <sub>3</sub>	20.6	20.4
20.62	OCOCH <sub>3</sub>	20.8	20.6
20.75	OCOCH <sub>3</sub>	21.0	20.7
29.4			
29.6			
29.7			
63.8	CH <sub>2</sub> O	63.9	62.6, 63.8
75.5	CHO	75.5	75.5
75.8	CHO	75.8	75.6, 76.6
77.2	CHO	77.7	77.0, 77.6
103.7	OCO	103.7	103.7
169.8	CO	169.7	169.7
170.1	CO	170.1	170
170.7	CO	170.6	170.6

El análisis en HPLC de PpHx3 mostró un pico mayoritario el cual presentó un tiempo de retención de 35.56 min (**Figura 23 A** izquierda) y a su derecha se encuentra el espectro de absorción. Después de realizar la curva estándar con PpHx3 a diferentes concentraciones se realizó una curva de calibración para cuantificar el contenido de este compuesto en los diferentes extractos obtenidos para *P. peltatum* (**Tabla 9**), encontrándose en dos extractos orgánicos: la preparación tradicional y en el sobrenadante del extracto acuoso. Sin embargo, en el precipitado del extracto acuoso no se encontró PpHx3, por lo que se continuó con la búsqueda de un biomarcador para este extracto. Las señales espectroscópicas de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ , para la identificación del compuesto contenido en PpHx3 se muestran en la **Tabla 10**.



**Figura 23.** **A** Cromatograma y espectro de absorción correspondiente a PpHx3 y **B** curva de calibración.

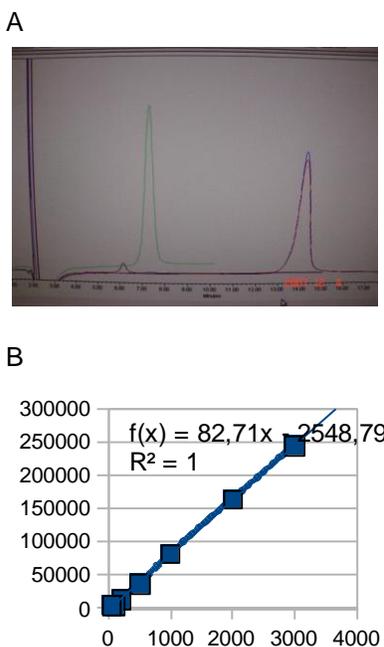
**Tabla 9.** Concentraciones del compuesto presente en PpHx3 en diferentes extractos de *Psacalium peltatum*

Extracto	Compuesto (mg/g de extracto)
Preparación tradicional	10.98
Hexano	21.05
Diclorometano	18.36
Acuoso sobrenadante	15.01
Acuoso precipitado	nd

**Tabla 10.** Señales espectroscópicas de <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H para PpHx3

Señales espectroscópicas de RMN			
<sup>13</sup> C		<sup>1</sup> H	
193,53	122,15	2,09	7,4
170,68	121,18	2,11	7,42
149,04	116,57	2,12	7,43
142,53	61,81	2,75	7,82
141,57	58,71	2,78	7,83
133,58	26,87	4,35	8,25
130,49	21,28	4,44	8,26
130,36		5,32	8,28
129,52		7,26	8,29
125,54		7,35	8,31
124,89		7,39	11

El producto de hidrólisis del precipitado del extracto acuoso de *P. peltatum*, al ser analizado mediante HPLC, presentó un pico mayoritario a los 6.7 min, el cual correspondió con uno de los estándares de carbohidratos evaluados, la fructosa (**Figura 24 A**).

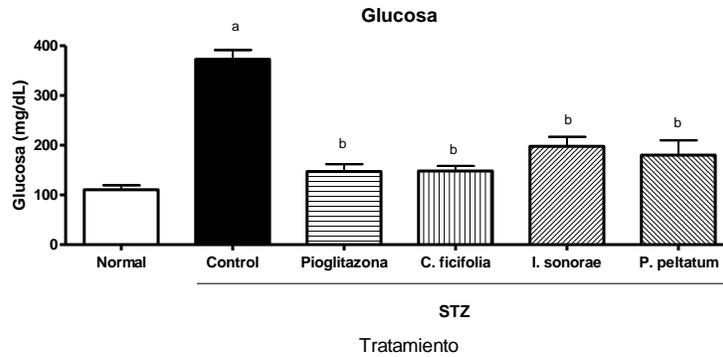


**Figura 24. A** Cromatógrama y **B** curva de calibración del producto de hidrólisis del extracto acuoso de *P.peltatum*.

De los compuestos anteriormente detectados, se eligieron como marcadores de los extractos el DQI, para *C. ficifolia*; los glucósidos de cucurbitacina 1 y 2, para *I. sonorae* y finalmente el fructano, para *P. peltatum*.

## 7.2 Efecto de *C. ficifolia*, *I.sonorae* y *P. peltatum* sobre la concentración de glucosa, insulina, triglicéridos y citocinas

El efecto ejercido por las especies vegetales bajo estudio sobre la concentración de glucosa de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina se muestra en la **Figura 25**. Se observa que el grupo Normal (ratones sanos a los cuales se les administró solución salina isotónica, SSI) presentan una concentración de glucemia de  $110.67 \pm 21.41$  mg/dL y el grupo Control, integrado por ratones con diabetes experimental mostró una glucemia de  $372.80 \pm 21.85$ , estadísticamente superior al grupo Normal. Por otro lado, el grupo al que se le administró pioglitazona, (como control positivo), sensibilizador de los efectos de la insulina, disminuyó de manera significativa la glucemia, de  $357.45 \pm 11.24$  a  $156.25 \pm 16.80$  mg/dL ( $p < 0.05$ ), con respecto a los grupos que recibieron los extractos acuosos de *C. ficifolia*, *I.sonorae* y *P. peltatum* (precipitado), también provocaron la disminución de la glucosa de manera significativa, observando que el valor en la concentración de glucosa al final del tratamiento para *C. ficifolia* es ligeramente menor a pioglitazona  $148.33 \pm 25.18$  mg/dL ( $p < 0.05$ ).



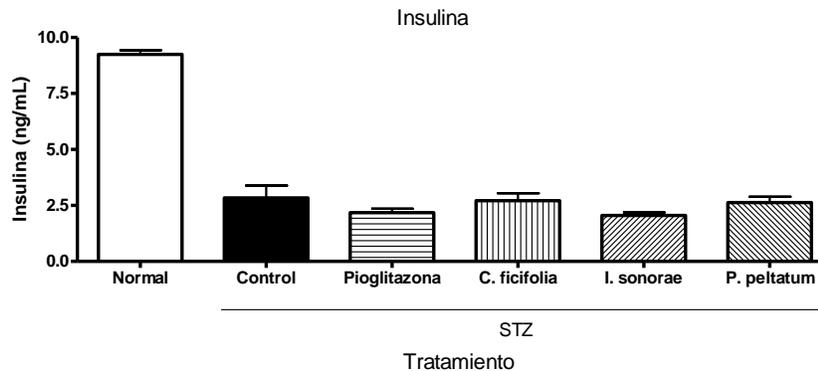
**Figura 25.** Efecto de los extractos acuosos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* sobre la concentración de glucosa de ratones con diabetes experimental. Posterior a 30 días de tratamiento.

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, n=8

<sup>a</sup> p<0.05 vs Normal

<sup>b</sup> p<0.05 vs Control

Con el objetivo de investigar si los extractos hipoglucémicos de las especies vegetales bajo estudio ejercían su efecto a través del aumento en la concentración de insulina, se evaluó el efecto producido por la administración de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* sobre la concentración de esta hormona (**Figura 26**). Se observó que el control positivo (pioglitazona), como se esperaba, no incrementa la concentración de insulina, respuesta que también presentan las tres especies vegetales bajo estudio.



**Figura 26.** Efecto de los extractos acuosos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* en la concentración de insulina de ratones con diabetes experimental

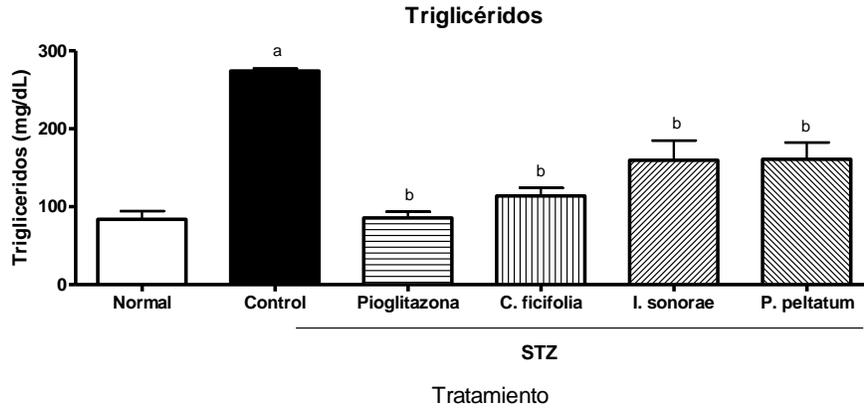
Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, n=8

<sup>a</sup> p<0.05 vs Normal.

<sup>b</sup> p<0.05 vs Control.

En la **Figura 27** se muestran los efectos benéficos de los extractos hipoglucémicos sobre la concentración plasmática de triglicéridos, cuyos valores en los pacientes diabéticos son superiores a 150 mg/dL (valor normal), y en ratones normoglucémicos al inicio del tratamiento oscilaron de 80.51 a 83.78 mg/dL, el grupo con diabetes experimental, como se esperaba, presentó valores estadísticamente superiores ( $274.15 \pm 6.45$  p<0.05) y los tratamientos con

pioglitazona y con los tres extractos hipoglucémico disminuyeron ésta concentración de manera estadísticamente significativa.



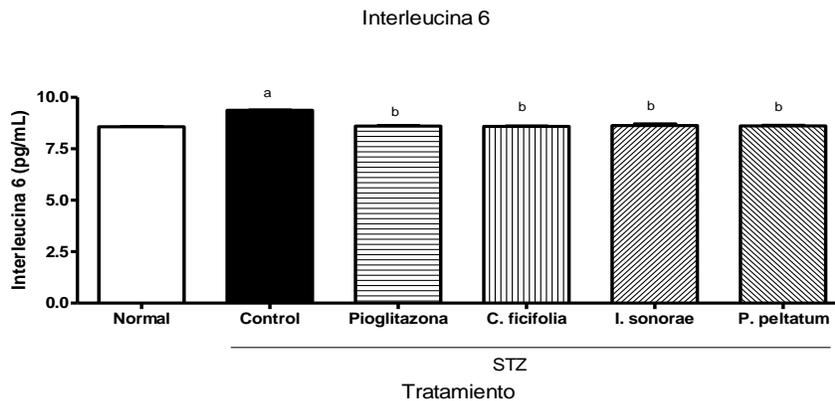
**Figura 27.** Efecto de los extractos acuosos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* en la concentración de triglicéridos de ratones con diabetes experimental

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, n=8

<sup>a</sup> p<0.05 vs Normal.

<sup>b</sup> p<0.05 vs Control.

Con el objetivo de conocer el efecto de los extractos hipoglucémico sobre la inflamación, la cual es una característica que presentan los pacientes diabéticos, se evaluó la concentración plasmática de diferentes citocinas proinflamatorias. Los valores de IL-6 (**Figura 28**) en los ratones con diabetes experimental fueron estadísticamente superiores en relación a los ratones del grupo normal ( $9.37 \pm 0.08$  y  $8.57 \pm 0.04$  pg/mL respectivamente, p<0.05); la administración con pioglitazona ( $8.6 \pm 0.1$  pg/mL) redujo significativamente la concentración de IL-6. Por su parte, la administración con los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* redujo de manera significativa la concentración de IL-6, normalizando sus valores.



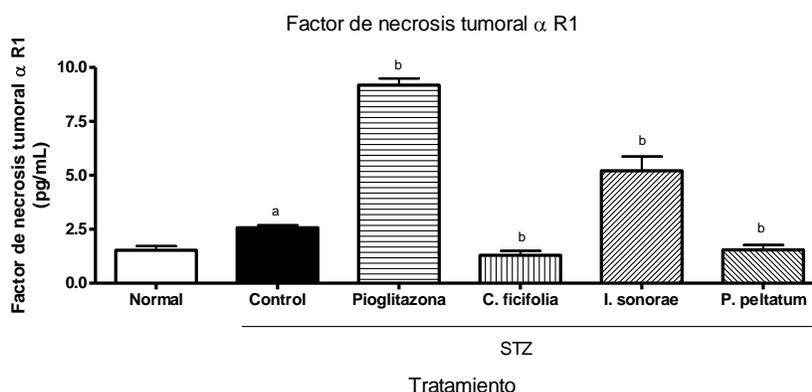
**Figura 28.** Efecto anti inflamatorio de los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* en la concentración de Interleucina 6 (IL-6) de ratones con diabetes experimental

Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, n=8

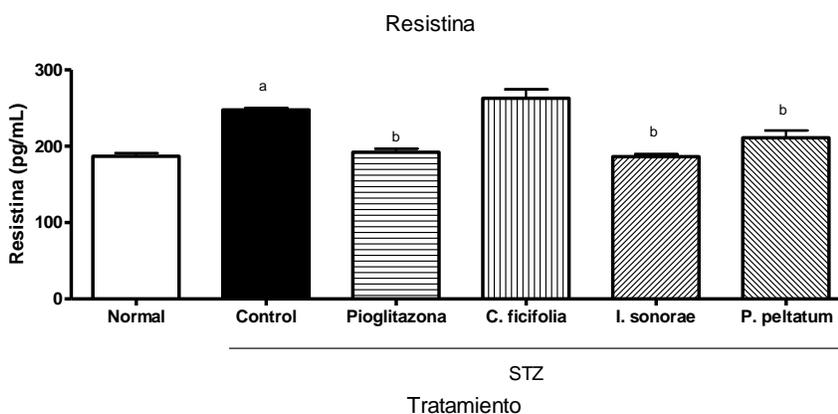
<sup>a</sup> p<0.05 vs Normal.

<sup>b</sup> p<0.05 vs Control.

En relación con otro marcador de inflamación, TNF $\alpha$  (**Figura 29**), se evaluó su receptor 1, ya que a éste se le ha asociado directamente con la DM2. Los valores que presenta el grupo diabético fueron estadísticamente superiores al grupo normal ( $2.57 \pm 0.28$  contra  $1.31 \pm 0.78$  pg/mL, respectivamente,  $p < 0.05$ ). La administración de pioglitazona indujo el incremento significativo de TNF $\alpha$ R1 ( $9.18 \pm 0.82$  pg/mL). Mientras *C. ficifolia* y *P. peltatum* disminuyeron de manera significativa los valores de esta citocina ( $1.3 \pm 0.63$  y  $1.54 \pm 0.61$  pg/mL  $p < 0.05$ ), aproximándose al valor del grupo normal, el precipitado de *I. sonoreae* incrementó significativamente ( $5.22 \pm 1.47$  pg/mL,  $p < 0.05$ ) los valores de TNF $\alpha$ R1.



**Figura 29.** Efecto antiinflamatorio de los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia* e *I. sonoreae* y el precipitado de *P. peltatum* en la concentración de factor de necrosis tumoral  $\alpha$ R1 (TNF $\alpha$ -R1) de ratones con diabetes experimental. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ .  
<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs Control.

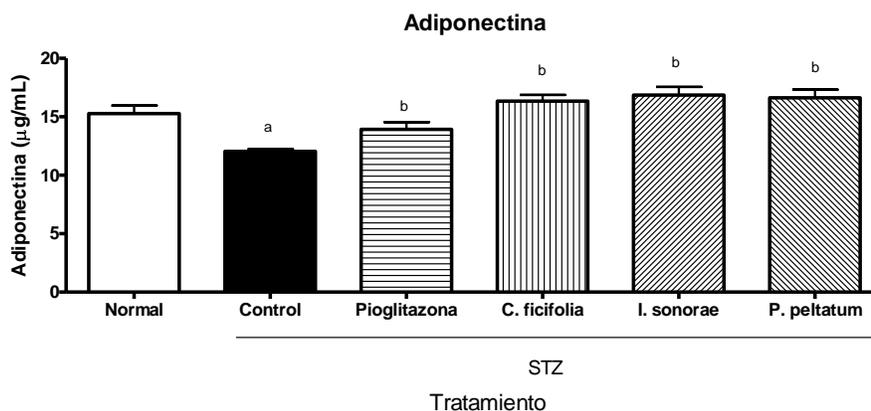


**Figura 30.** Efecto antiinflamatorio de los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia* e *I. sonoreae* y el precipitado de *P. peltatum* en la concentración de resistina de ratones con diabetes experimental. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ .  
<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs Control.

El efecto de los extractos hipoglucémicos sobre la concentración de resistina se muestra en la **Figura 30**. El grupo diabético (Control) fue significativamente elevado en relación al grupo Normal ( $247.63 \pm 6.65$  y  $186.91 \pm 12.28$  pg/mL). El grupo que recibió pioglitazona disminuyó de

manera significativa la concentración de esta citocina a  $192.02 \pm 14.21$ , disminución que también se observó con la administración de *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum*, mientras que *C. ficifolia* no ejerció efecto alguno.

La concentración de adiponectina (**Figura 31**), citocina antiinflamatoria, en ratones con diabetes experimental fue de  $12.03368 \pm 0.43525 \mu\text{g/mL}$  y el grupo Normal fue significativamente diferente ( $15.2797 \pm 1.542 \mu\text{g/mL}$ ), la administración con pioglitazona incrementó significativamente la concentración de esta citocina y la administración de las tres especies vegetales bajo estudio incrementaron de manera significativa los valores de esta citocina ( $p < 0.05$ ), restaurando los valores normales.



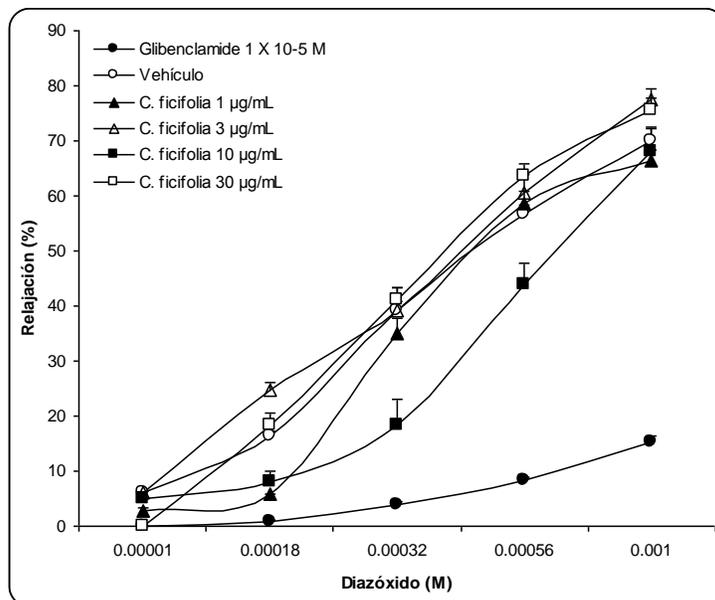
**Figura 31.** Efecto anti inflamatorio de los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* y el precipitado de *P. peltatum* en la concentración de adiponectina de ratones con diabetes experimental. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs Control.

### 7.3 Efecto de los extractos hipoglucémicos sobre el potencial bloqueador de los canales $K_{ATP}$

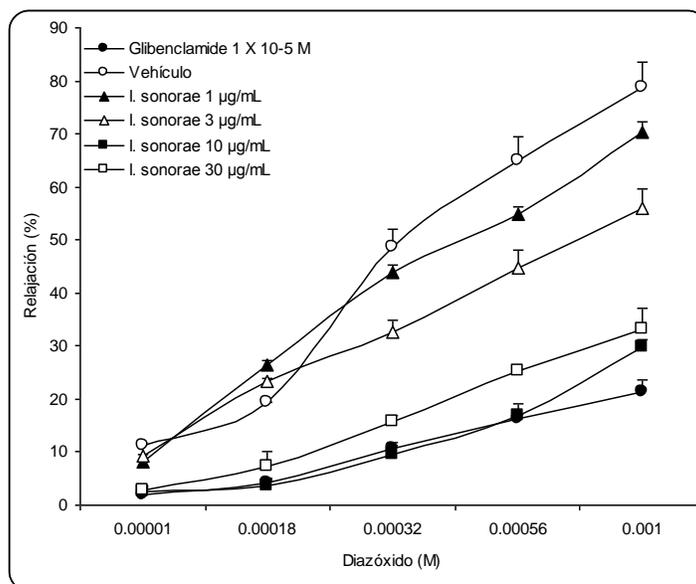
Con el objetivo de investigar si los extractos ejercen su efecto a través del bloqueo de los canales  $K_{ATP}$ , se empleó un tejido constituido por músculo liso vascular (aorta), el cual presenta una gran cantidad de estos canales. El efecto de la incubación durante 30 min con *C. ficifolia* a diferentes concentraciones sobre la relajación de la aorta se observa en la **Figura 32**. Se puede ver el comportamiento de los tejidos al agregar al sistema diferentes dosis de diazóxido, la curva que representa los tejidos incubados con glibenclamida presenta un porcentaje de relajación (**Tabla 9**;  $18.32 \pm 1.58$ ) estadísticamente diferente en relación al vehículo DMSO/EtOH ( $74.41 \pm 3.36$   $p < 0.05$ ), también se observa que ninguna de las concentraciones de *C. ficifolia* evaluadas ejerce efecto sobre la relajación de la aorta.

La incubación de *I. sonorae* (1, 3, 10 y 30  $\mu\text{g/mL}$ ), ilustradas en la **Figura 33**, mostró que las concentraciones de 10 y 30  $\mu\text{g/mL}$ , evitan la relajación de los anillos aórticos ( $29.71 \pm 1.59$  y  $33.12 \pm 4.07$ , respectivamente) de manera similar a la glibenclamida, siendo estadísticamente diferentes a la relajación inducida por DMSO/EtOH. Las concentraciones de 1 y 3  $\mu\text{g/mL}$  no mostraron efecto.

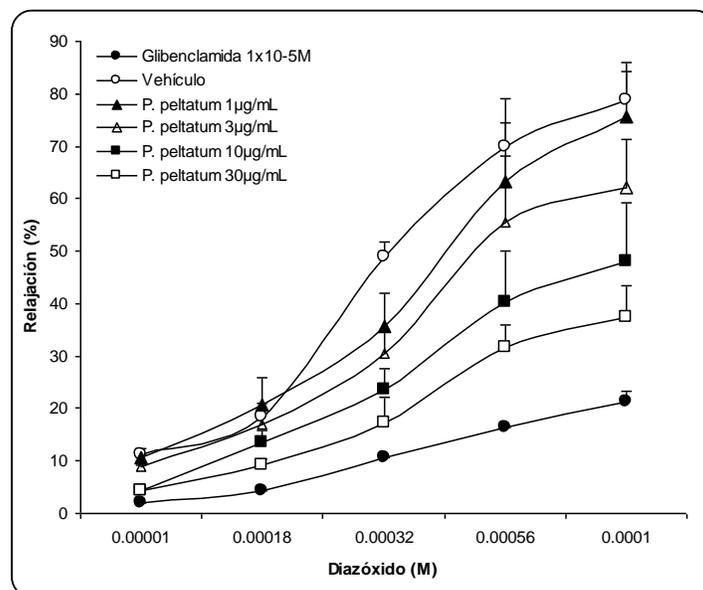


**Figura 32.** Efecto del extracto acuoso de *C. ficifolia* en la relajación de la aorta de rata macho. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, n=8.

La incubación con el precipitado del extracto hipoglucémico de *P. peltatum* (Figura 34) no presentó ningún efecto sobre la relajación de los anillos aórticos.



**Figura 33.** Efecto del extracto acuoso de *I. sonorae* en la relajación de la aorta de rata macho. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, n=8.



**Figura 34.** Efecto del precipitado del extracto acuoso de *P. peltatum* en la relajación de la aorta de rata macho. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=8$ .

**Tabla 9.** Relajación inducida por diazóxido en los anillos aórticos de aorta precontraídos con fenilefrina en presencia de los extractos acuosos de *C. ficifolia* e *I. sonorae*.

Concentración	IC <sub>50</sub> (1x10 <sup>-5</sup> M).	R <sub>max</sub> (%)
1 µg/mL <i>C. ficifolia</i>	2.90±0.85	66.85±1.73
<i>I. sonorae</i>	3.32±0.54	70.27±2.01
<i>P. peltatum</i>	2.97±1.10	75.56±10.5
3 µg/mL <i>C. ficifolia</i>	2.70±0.96	77.46±3.73
<i>I. sonorae</i>	2.51±0.04	55.84±3.73
<i>P. peltatum</i>	2.86±59	62.19±.00
10 µg/mL <i>C. ficifolia</i>	3.20±0.44	68.12±4.45
<i>I. sonorae</i>	6.81±0.6 <sup>a</sup>	29.71±1.59 <sup>a</sup>
<i>P. peltatum</i>	2.89±0.85	48.02±11.1
30 µg/mL <i>C. ficifolia</i>	3.00±0.22	75.55±2.34
<i>I. sonorae</i>	5.73±0.74 <sup>a</sup>	33.12±4.07 <sup>a</sup>
<i>P. peltatum</i>	2.56±0.99	37.36±6.00
10 <sup>-5</sup> M Glibenclamida	8.15±3.86 <sup>a</sup>	18.32±1.58 <sup>a</sup>
2.5:1DMSO/EtOH	2.80±0.77	74.41±3.3

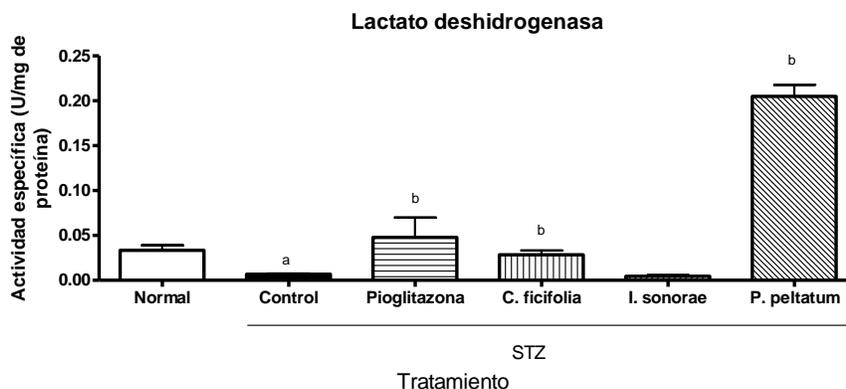
Los datos representan el promedio  $\pm$  error estándar ( $n=6$  para *C. ficifolia* e *I. sonorae*;  $n=12$  para los grupos de glibenclamida y el vehículo).

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. Vehículo.

#### 7.4 Efecto de los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* sobre la actividad de las enzimas Lactato deshidrogenasa (LDH), Glucosa-6-fosfatasa (G6Fasa) y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6FD)

Con el objetivo de evaluar si la administración de los extractos ejercen su efecto hipoglucémico a través de modificar la actividad de enzimas importantes del metabolismo de los carbohidratos, se evaluaron las siguientes tres enzimas. La actividad de LDH (**Figura 35**) para los ratones con diabetes experimental fue significativamente más baja en relación al grupo Normal ( $0.00676 \pm 0.00209$  y  $0.03344 \pm 0.01696$  U/mg de proteína, respectivamente). Se observó que la administración de pioglitazona incrementa la actividad de la LDH de manera significativa, al igual

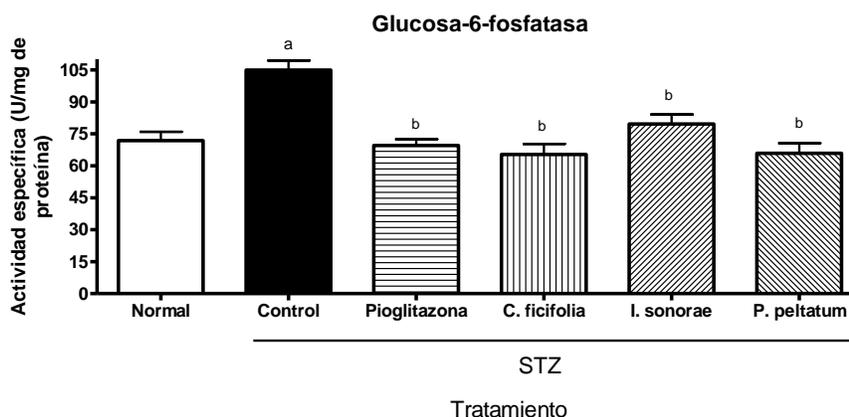
que *P. peltatum* ( $0.04775 \pm 0.06247$  y  $0.20485 \pm 0.03160$  U/mg de proteína, respectivamente), mientras que la administración de *C. ficifolia* la normaliza ( $0.02843 \pm 0.01386$  U/mg de proteína), *I. sonoreae* no ejerce efecto.



**Figura 35.** Efecto de la administración ip de *C. ficifolia*, *I. sonoreae* y *P. peltatum* sobre la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa, en el hígado ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). La actividad de la enzima se determinó al final de los tratamientos (30 días). Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8).

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $P < 0.001$  vs Control.

La actividad de G6Pasa (**Figura 36**) para los ratones con diabetes experimental fue significativamente más alta en relación al grupo Normal ( $104.89 \pm 11.87$  y  $71.83 \pm 12.47$  U/mg de proteína). Se observa que la administración de pioglitazona la disminuye de manera significativa, al igual que las tres especies vegetales bajo estudio.

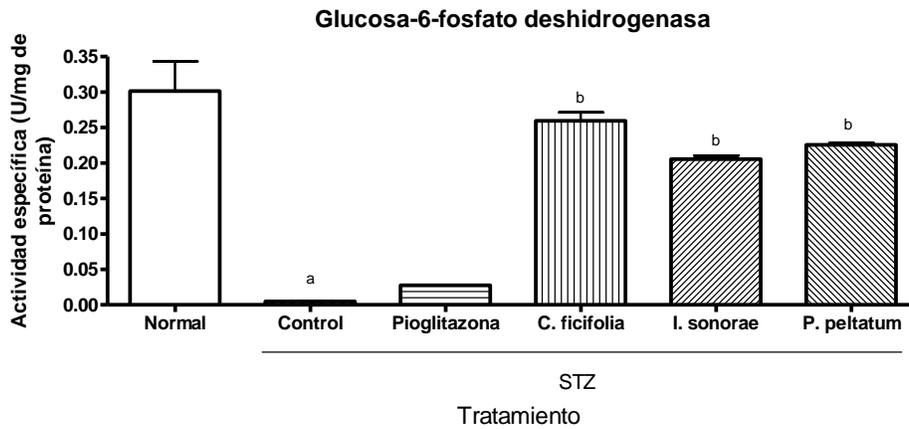


**Figura 36.** Efecto de la administración ip de *C. ficifolia*, *I. sonoreae* y *P. peltatum* sobre la actividad de la enzima Glucosa 6-fosfatasa, en el hígado de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). Efecto de la actividad de la enzima se determinó al final de los tratamientos (30 días). Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8).

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $P < 0.001$  vs Control.

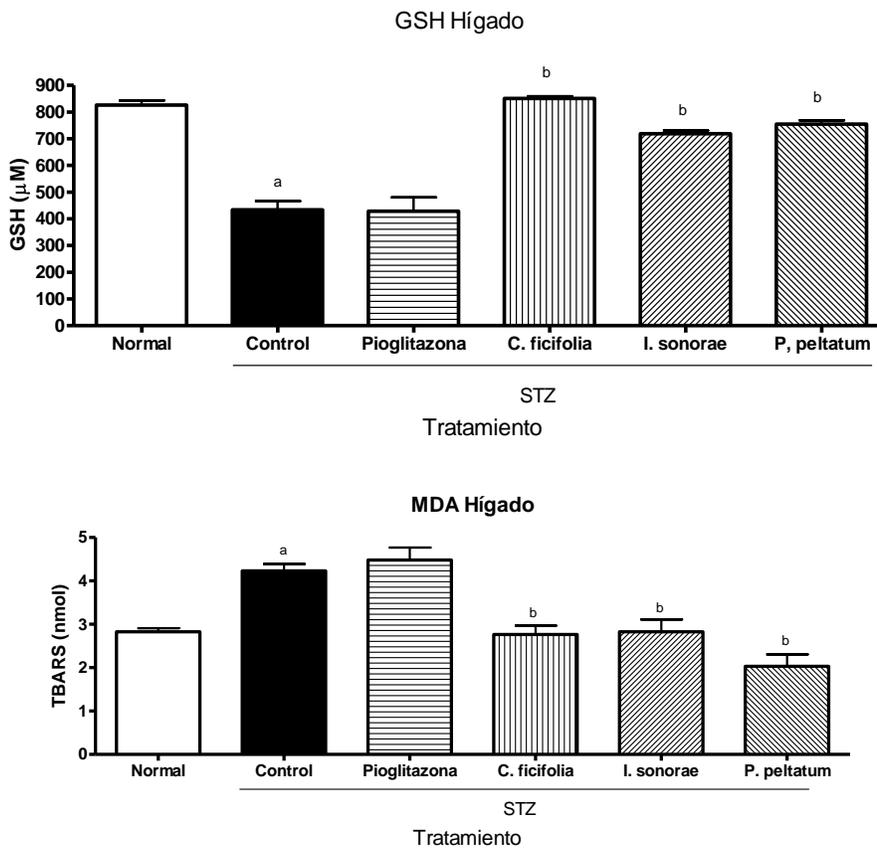
La actividad de G6PD (**Figura 37**) para los ratones con diabetes experimental fue significativamente más baja en relación al grupo Normal ( $0.00470 \pm 0.00272$  y  $0.30130 \pm 0.10231$  U/mg de proteína, respectivamente). La administración de pioglitazona no ejerce efecto. Mientras

que la administración de los tres extractos hipoglucémicos induce el incremento significativo en la actividad específica de esta enzima.



**Figura 37.** Efecto de la administración ip de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* sobre la actividad de la enzima Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en el hígado de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ). La actividad de la enzima se determinó al final de los tratamientos (30 días). Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8).

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $P < 0.001$  vs Control.



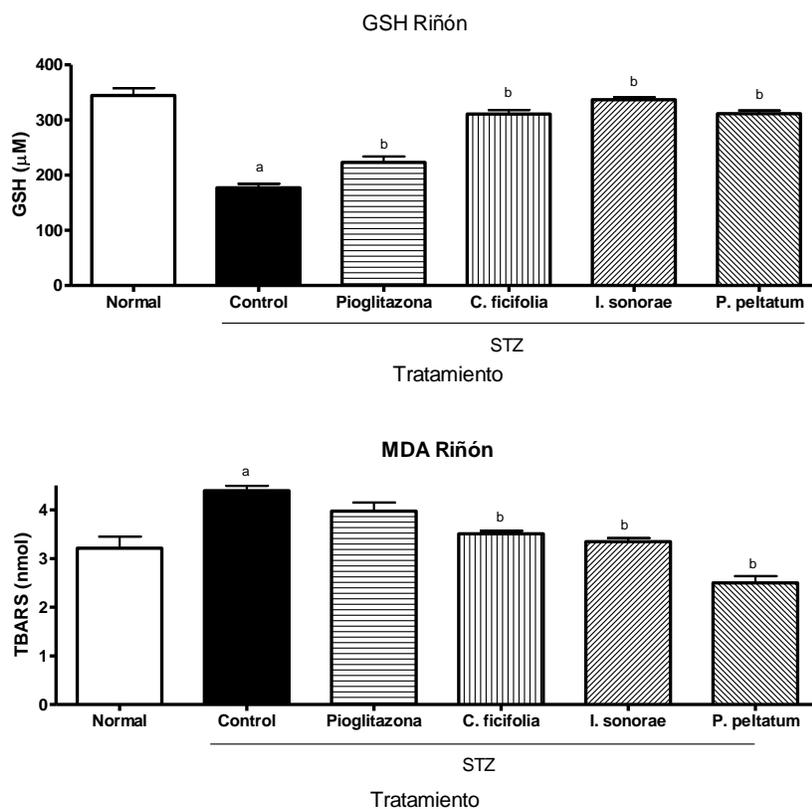
**Figura 38.** Efecto antioxidante de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* en la concentración de GSH y MDA en el hígado de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8).

<sup>a</sup>  $P < 0.001$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs Control.

### 7.5 Efecto de los extractos en el contenido de glutatión reducido (GSH) y malondialdehído (MDA)

Con el objetivo de investigar si el efecto hipoglucémico de la administración crónica (30 días) de los extractos acuosos de *C.ficifolia*, *I. sonorae* y el precipitado de *P.peltatum* está acompañado por un efecto antioxidante, se evaluó la concentración de GSH en diferentes órganos de ratones con diabetes experimental.

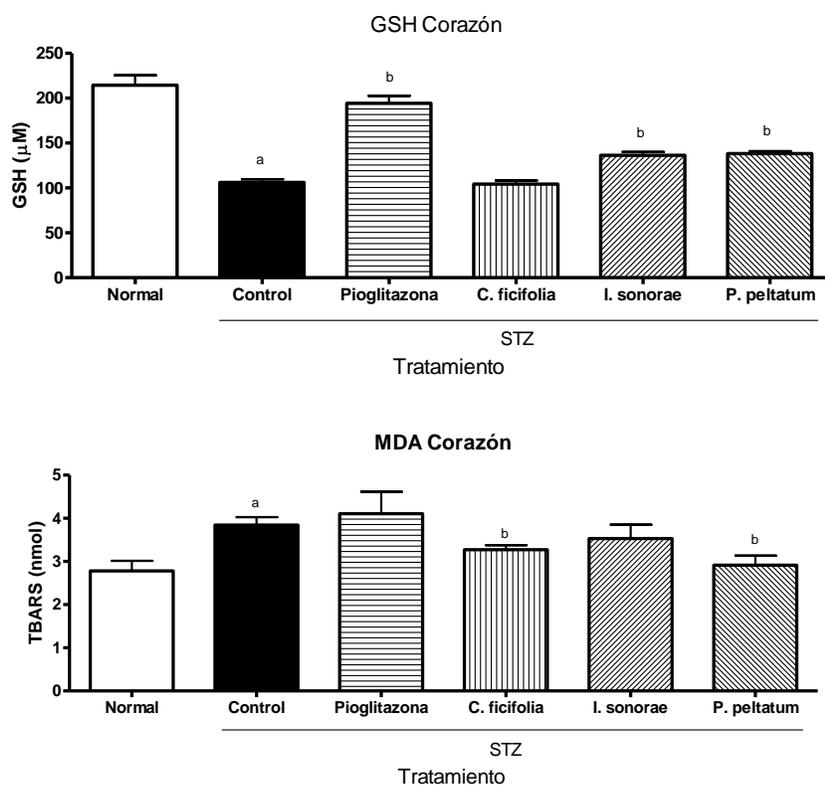
La concentración de GSH en el hígado (**Figura 38**) de ratones con diabetes fue significativamente más bajo en relación al grupo Normal ( $444.17 \pm 63.75$  y  $825.79 \pm 42.66 \mu\text{M}$ ), lo cual correlaciona con los valores calculados para MDA (**Figura 38**), en donde su concentración en ratones con diabetes experimental fue significativamente más alta al compararla con el grupo normal ( $4.23 \pm 0.49$  y  $2.83 \pm 0.26 \text{ nmol}$ ). En ambos marcadores de estrés oxidante la pioglitazona no tuvo efecto; Por su parte, las tres especies vegetales hipoglucémicas bajo estudio incrementaron significativamente el GSH, dicho efecto se vio reflejado también en la disminución significativa en la concentración de MDA.



**Figura 39.** Efecto antioxidante de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* en la concentración de GSH y MDA en el riñón de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=8$ ).  
<sup>a</sup>  $P < 0.001$  vs Normal.  
<sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs Control.

En relación con los valores de GSH en el riñón de ratones con diabetes experimental (**Figura 39**, grupo Control), al finalizar el tratamiento fueron significativamente más bajos que los del grupo Normal ( $177.03 \pm 19.52$  y  $344.4 \pm 26.7 \mu\text{M}$ ). Por el contrario, los valores de MDA en el

riñón del grupo Control fueron significativamente más altos comparados con el grupo Normal ( $4.39 \pm 0.27$  y  $3.21 \pm 0.49$  nmolL). La administración de pioglitazona incrementó de manera significativa la concentración de GSH, sin embargo, este efecto no se vio reflejado en la concentración de MDA, en el cual este medicamento no tuvo efecto. Sin embargo, *C. ficifolia*, *I. sonoreae* y el precipitado de *P. peltatum* incrementaron de manera significativa el contenido de GSH. Dicho efecto también se vio reflejado en la concentración de MDA, al inducir la reducción significativa de este marcador.

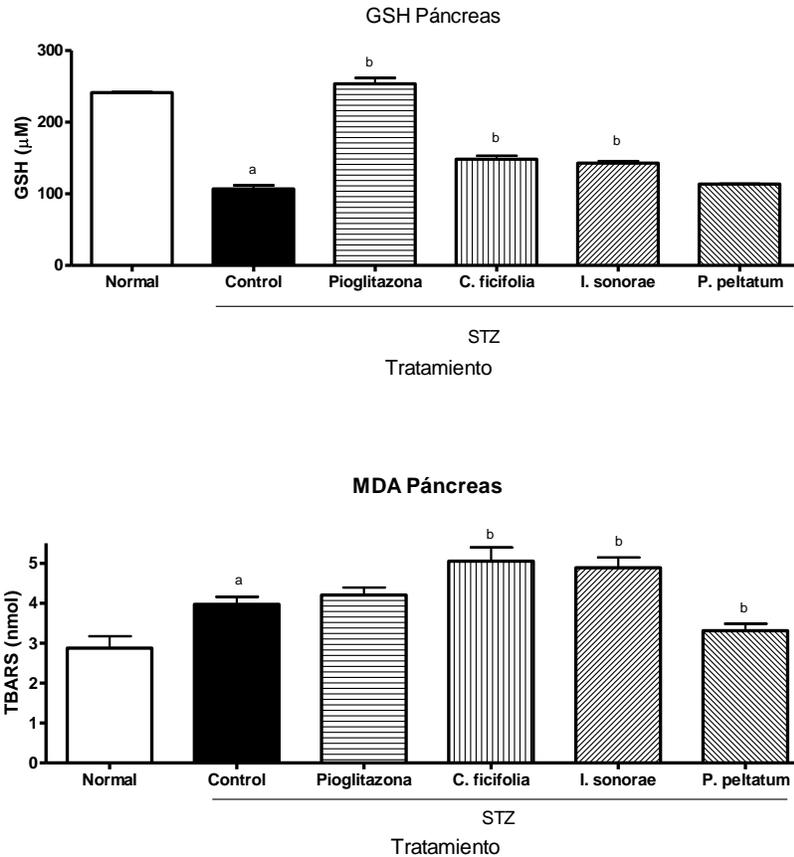


**Figura 40.** Efecto antioxidante de *C. ficifolia*, *I. sonoreae* y *P. peltatum* en la concentración de GSH y MDA en el corazón de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=8$ ).

<sup>a</sup>  $P < 0.001$  vs Normal.

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs Control.

En el caso del corazón, el comportamiento de los grupos Control y Normal fue similar a los anteriores (**Figura 40**). Aunque la pioglitazona incrementó la concentración de GSH, no disminuyó el contenido de MDA. Por otro lado, *C. ficifolia* no presentó efecto sobre GSH y pero promovió la disminución de MDA. En lo referente a *I. sonoreae* indujo el incremento de GSH, sin embargo, no ejerció efecto en MDA. Y la administración de *P. peltatum* indujo incremento de GSH y disminución de MDA.



**Figura 41.** Efecto antioxidante de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* en la concentración de GSH y MDA en el páncreas de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina. Los datos representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8).

<sup>a</sup>  $P < 0.001$  vs Normal.

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  vs Control.

En el páncreas, el comportamiento de los grupos Normal y Control es igual al mostrado con los tejidos anteriores (**Figura 41**). Pioglitazona induce el incremento de GSH, sin embargo, no tiene efecto en MDA. *C. ficifolia* e *I. sonorae* provocan el incremento de GSH al igual que de MDA, mientras que *P. peltatum* no ejerce efecto en GSH pero disminuye MDA. En todos los casos los valores se comparan contra al grupo control.

## 8. DISCUSIÓN

En estudios previos, realizados por nuestro grupo, se mostró que la administración de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* reducen significativamente tanto la glucemia como los triglicéridos en ratones con diabetes inducida por aloxana. La dosis letal 50 en ratones sanos ( $LD_{50}$ , *per os*) calculada para *C. ficifolia* fue de 3.7 g/kg (Alarcon y cols., 2002b), mientras que para *I. sonorae* la  $LD_{50}$  fue de 2,158 g (Alarcon y col., 2002a).

En nuestro estudio, la dosis de 250 mg/kg (menor a la reportada anteriormente) de cada uno de los extractos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum*, redujo significativamente la glucosa y los triglicéridos en el plasma de ratones con diabetes inducida por estreptozotocina. Después de 30 días de tratamiento con los extractos hipoglucémicos, ningún ratón mostró efectos adversos, tales como diarrea, disminución de la actividad motora o cambios significativos en el peso. Tampoco se presentaron alteraciones macroscópicas en hígado, corazón, riñones y pulmones. Esos resultados confirman la reproducibilidad de los efectos hipoglucémicos de las tres especies vegetales en estudio, en diferentes modelos de diabetes experimental. La inducción de diabetes mediante la administración de STZ es considerado el mejor modelo para generar diabetes experimental, ya que es más estable y menos severa que aquella generada con aloxana (Rodríguez, 1999). Así, esta investigación reporta por primera vez el efecto hipoglucémico de *I. sonorae* en este modelo con STZ.

Una de las contribuciones más importantes de esta investigación fue iniciar el estudio del posible mecanismo de acción de los extractos acuosos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* como bloqueadores de los canales  $K_{ATP}$  *in vitro*, empleando agonistas y antagonistas de estos canales en músculo liso vascular, tales como diazóxido y glibenclamida, respectivamente.

Los resultados mostraron que el extracto hipoglucémico de *I. sonorae* caracterizado por su contenido de cucurbitacinas evitó la relajación inducida por diazóxido de la aorta torácica de rata precontraída con fenilefrina. El extracto acuoso de *Ibervillea sonorae* (10  $\mu$ g correspondieron a  $5 \times 10^{-4}$  M y  $7 \times 10^{-4}$  M, y 30  $\mu$ g correspondieron a  $1.5 \times 10^{-3}$  M y  $2.37 \times 10^{-3}$  M de los compuestos 1 y 2, respectivamente) provocó una respuesta similar a la observada con glibenclamida (18.32% de relajación) en la aorta torácica de rata, este compuesto fue incluido como control positivo en este estudio. Tal como la glibenclamida, que actúa como un bloqueador no selectivo de los canales  $K_{ATP}$  (Campos y col., 2009) *I. sonorae* puede actuar directamente en las células  $\beta$  pancreáticas como modulador de la secreción de insulina debido a su efecto sobre los canales de  $K_{ATP}$ ; sin embargo, son necesarios estudios adicionales para confirmar que el extracto hipoglucémico de *I. sonorae* actúa directamente en las células  $\beta$  del páncreas como bloqueador de los canales  $K_{ATP}$  a las concentraciones de 10 y 30  $\mu$ g/mL. Una disminución en el porcentaje de inhibición (29.71%) fue observada con 10  $\mu$ g/mL, este efecto se puede explicar por la posible presencia de algunos compuestos en el extracto, tales como las saponinas esteroidales (catarantinas), cucurbitacinas y otros triterpenos tetracíclicos, así como los péptidos parecidos a la insulina reportados para las Cucurbitaceas (Marles y Farnsworth, 1995). Sin embargo las interacciones de estos compuestos

podrían afectar su estructura y por lo tanto, evitaría su interacción sobre los canales de  $K_{ATP}$  y el efecto de *I. sonorae* cuando la concentración de dichos compuestos se incrementa.

En contraste, los extractos acuosos de *C. ficifolia* y *P. peltatum* fueron caracterizados químicamente por su contenido de DQI y de una fructana de tipo inulina, respectivamente, no mostrando ninguna influencia sobre los canales  $K_{ATP}$  en la aorta torácica de rata. La ausencia de este efecto puede ser atribuida a la conformación específica de las subunidades del canal  $K_{ATP}$ : el poro está formado por la subunidad Kir, la cual actúa como rectificador de la entrada de potasio y la subunidad SUR, la cual es la encargada de regular el receptor para sulfonilureas. Kir 6.1 y SUR 2B constituyen el canal  $K_{ATP}$  en VSM, mientras que en las células  $\beta$  pancreáticas está constituido por Kir 6.2 y SUR 1 (Nagashima y col., 2004). Sin embargo, con ambas conformaciones la glibenclamida e *I. sonorae* presentan afinidad. Anteriormente, se reportó que todos los derivados de sulfonilureas presentan una actividad no selectiva para estos canales, excepto la tolbutamida que es más afín a las células  $\beta$  pancreáticas. Por lo anterior, es posible que *C. ficifolia* y *P. peltatum* no hayan presentado efecto sobre los anillos de aorta torácica por diferencias en su afinidad con las mencionadas subunidades, o que su mecanismo de acción sea diferente al de *I. sonorae*.

En relación con los compuestos identificados en los tres extractos se tiene conocimiento que el DQI es un mediador de los efectos de la insulina (Larner, 2002); comúnmente se encuentra en plantas, insectos, y en pequeñas cantidades en tejidos animales, incluyendo placenta, orina y sangre. Xia and Wang, 2006b han reportado la presencia de DQI en el fruto de *C. ficifolia*, y durante el tratamiento con el extracto se puede incrementar la actividad de la insulina.

En relación con los compuestos identificados en los extractos de las plantas incluidas en el presente estudio, encontramos que el DQI es uno de los componentes principales de *C. ficifolia*, Larner (2002) identificó al DQI, junto con el mioinositol, en la fracción lipídica denominada GPI glicosil fosfatidil inositol en células de hepatoma de rata. También encontró que los pacientes con DM2 mostraron un patrón de incremento de mioinositol y disminución en la excreción urinaria de DQI, y en estos pacientes el DQI se asocia con a la sensibilidad a insulina. En la misma referencia, se ha puesto de manifiesto que en hígado de rata, el DQI (1-10 mg/kg) disminuye la hiperglucemia (50%), previniendo la resistencia a la insulina periférica inducida por glucosamina, pero sin afectar la liberación de glucosa hepática; su mecanismo es explicado por el almacenamiento del DQI incorporado en el precursor de lípidos glicosil fosfatidil inositol y su subsecuente liberación por fosfolipasas, reguladas por insulina. Además, en estudios con miotubos de rata se demostró que diferentes derivados de inositol, entre los que se encuentran el D-quiró-, el L-quiró-, epi-, mucoinositol y el pinitol (derivado metilado del DQI), estimularon la translocación de GLUT4, como parte del mecanismo que explica el incremento en la incorporación de glucosa en presencia de los derivados del inositol (Yap y col., 2007).

GLP-1 es una hormona, clasificada dentro del grupo de las incretinas, es sintetizada en el intestino, y liberada a la circulación después de ingerir alimentos, produciendo y controlando hasta

el 60 % de la secreción de insulina, se ha demostrado que los efectos de esta hormona, sobre la liberación de insulina son mediados por su unión a las proteínas G de las células  $\beta$  pancreáticas, activando la adenilato ciclasa, e induciendo el incremento de AMPc, el cual a su vez activa a la proteína cinasa A y finalmente, estimula la secreción de insulina, lo cual describe un mecanismo independiente de los canales  $K_{ATP}$  (McClenaghan y col., 2006). Por otro lado, se sabe que ésta incretina ejerce un efecto parecido a la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en hígado de rata, músculo esquelético y tejido adiposo, además el tratamiento con GLP-1 en ratas con diabetes experimental, estimula la expresión, a nivel del RNAm y de la proteína, de los transportadores de glucosa GLUT-2 (hígado) y GLUT-4 (músculo esquelético y tejido adiposo), lo que establece un posible mecanismo por el cual GLP-1 ejerce su efecto hipoglucémico (Villanueva y col., 2001). Por lo tanto, mediante estos mecanismos puede ser explicada la actividad hipoglucémica de *C. ficifolia* excluyendo la actividad en músculo liso vascular.

Por otro lado, *C. ficifolia* e *I. sonorae* forman parte de la familia de las Cucurbitaceae, en ésta familia es frecuente la presencia de los cucurbitanos y los glucósidos de tipo cucurbitano, las cuales son actualmente reconocidos por sus actividades anticancerígenas y su amplio rango en efectos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, tales como purgante, antiinflamatorio, antifertilidad, hepatoprotectores, antimicrobianos, antihelméticos y antihiperoglucémicos (Chen y col., 2005; Paduch y col., 2007). Se ha demostrado que la esteviosida y la aglucona esteviol potencian la secreción de insulina de los islotes pancreáticos de manera dosis y glucosa dependiente, de esta manera, la presencia de dichos compuestos en el extracto de *I. sonorae* podría explicar su efecto hipoglucémico.

Por último, en *P. peltatum* está presente un fructano; aunque su síntesis se lleva a cabo en las hojas se transporta hacia los tallos de las plantas, en donde se acumula y de ahí es suministrado de acuerdo a las demandas energéticas de la planta. Los fructooligosacáridos del tipo inulina han despertado interés en la industria alimenticia, ya que se considera que actúan favoreciendo el crecimiento de bifidobacterias benéficas en el intestino (Alípio, 2000), tienen efectos anticancerígenos, estimulantes del sistema inmune, mejora la absorción de minerales, entre otros. Además de eso, presentan un bajo valor calórico (1-3 Kcal/g) con gran poder edulcorante, siendo ésta una excelente alternativa para sustituir la sacarosa en dietas especiales, por ejemplo para la dieta de las personas con diabetes (Incoll y Bonnett, 1996; Ninnes, 1999). Los fructooligosacáridos tienen un efecto favorable en el organismo, debido a que disminuyen los niveles del colesterol y triglicéridos en la sangre de personas de mediana edad, además favorecen la producción de GLP-1 (Jackson y col., 1999), el cual regula la secreción de la insulina directamente, o lo hace indirectamente a través de la regulación de otras hormonas como la incretina. Por lo tanto, la presencia de este fructano en *P. peltatum*, explica en parte su acción hipoglucemiante.

A pesar de la existencia de un gran número de agentes farmacéuticos, se ha renovado el interés hacia los remedios provenientes de plantas, debido a su bajo costo, y a que presentan

menores efectos secundarios, estos remedios podrían mejorar algunas de las complicaciones asociadas a la DM2. En estudios previos se ha mostrado que *C. ficifolia* y *P. peltatum* presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria (Alarcon y col., 2010; Roman y col., 2012). En el presente trabajo los ratones con diabetes experimental inducida por estreptozotocina presentaron niveles de GSH reducidos y MDA incrementados. El glutatión reducido (GSH) es un tiol que se presenta en abundancia en los organismos vivos. Los tioles juegan un papel importante en el mantenimiento del estado redox de la célula. También el GSH es un protector en contra de los efectos tóxicos de la peroxidación de lípidos de los sistemas celulares, actuando directamente como atrapador de los radicales libres (Tripathi y Chandra, 2009). La peroxidación de lípidos daña la función membranal, y sus productos tales como el MDA son empleados en la mayoría de las células los cuales han sido asociados con una variedad de enfermedades (Schauwen y Hesselink, 2004). El incremento en el contenido de TBARS en tejido hepático sugiere que el daño peroxidante puede estar involucrado en las disfunciones del hígado. Nuestros resultados muestran que el estrés oxidante fue significativamente revertido después de un tratamiento de 30 días con los extractos acuosos hipoglucémicos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* (250 mg/kg) en ratones con diabetes experimental, como se observa por el significativo incremento de los niveles de GSH y disminución de MDA ( $p < 0.001$ ). Esto indica que los compuestos presentes en las tres especies vegetales actúan como moléculas protectoras en contra del daño causado por el estrés oxidante producido en el hígado de ratones diabéticos. Por otro lado, en la DM2 se ha mostrado que la actividad de la G6PD disminuye; su desregulación favorece el incremento de la producción de ROS y la reducción en los niveles de NADPH y GSH (Wu y col., 2009). Es la enzima limitante de la vía de los fosfatos de pentosas y es la mayor fuente intracelular en la producción de NADPH (Park y col., 2005). El NADPH, está involucrado tanto en procesos anti como prooxidantes y sirve como cofactor para la reducción de GSSG (forma oxidada del glutatión), incrementando la forma reducida, GSH (Park y col., 2005). En esta investigación los ratones con diabetes experimental presentaron disminución significativa en la actividad de esta enzima ( $p < 0.001$ ) con respecto al grupo normal, y la administración de los tres extractos acuosos provocó la disminución significativa en la actividad de la G6PD ( $p < 0.001$ ), llevándola a valores cercanos a la del grupo control. Así, el incremento en GSH correlaciona con el incremento en la actividad de esta enzima. Por lo cual, el efecto antioxidante observado puede deberse al incremento en la actividad de la G6PD, que conduce al incremento de GSH. En relación al efecto antioxidante de los extractos sobre riñón, corazón y páncreas, los resultados fueron similares a los observados para el hígado, por lo que su uso como antioxidante es viable.

En relación con el metabolismo de la glucosa, una de las enzimas clave en la gluconeogénesis y glucogenólisis, es la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), cataliza la hidrólisis de glucosa-6-fosfato a glucosa y fosfato, La glucosa libre es transportada al exterior del hígado incrementando su concentración en el torrente sanguíneo, por lo que la G6Pasa juega un importante papel en la homeostasis de la glucosa (Wu y col., 2009).

En este estudio, la diabetes inducida con estreptozotocina incrementó la actividad de la G6Pasa, y la administración de los tres extractos acuosos hipoglucémicos normalizó la actividad de esta enzima en el modelo de diabetes experimental. El efecto fue similar al de pioglitazona.

El efecto final con las tres plantas sobre la actividad de la G6Pasa, se puede traducir en la disminución de la gluconeogénesis y como consecuencia, la disminución de la glucemia (Grempler y col., 2004).

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) disminuye en el hígado de ratones con diabetes experimental, y la administración de *C. ficifolia* restauró la actividad de esta enzima hasta alcanzar sus valores normales; el efecto fue similar al observado en presencia de pioglitazona (empleado como control positivo). El tratamiento con *I. sonorae* no tuvo efecto, y la actividad de LDH con *P. peltatum*, fue superior a los valores normales. La LDH en circulación ha sido usada como indicador de daño hepático en la diabetes, junto con los efectos tóxicos de los tratamientos. Aunque en el presente trabajo no se evaluó actividad de esta enzima en el suero de ratones, en estudios previos se determinó que las actividades de las transaminasas hepáticas no mostraron ninguna alteración, en presencia del extracto de *P. peltatum* (Alarcón-Aguilar y col., 2010), lo cual es indicativo de que las concentraciones administradas a los ratones no fueron tóxicas.

Las concentraciones plasmáticas de citocinas proinflamatorias se encuentran incrementadas en el suero de ratones tratados con estreptozotocina y la administración de los extractos hipoglucémicos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* las disminuyen, con la excepción de resistina en presencia de *C. ficifolia*, generando una respuesta similar a pioglitazona. En cambio, la concentración plasmática de adiponectina, citocina antiinflamatoria, se encuentra disminuida en los ratones diabéticos, y los tratamientos con los tres extractos de plantas la normalizan. Este efecto es similar al que ocurre en presencia de pioglitazona, la cual se conoce que funciona como droga antiinflamatoria (Gao y Ye, 2012).

Por otro lado, entre los compuestos identificados en cada una de las especies vegetales, están DQI para *C. ficifolia*, cucurbitacinas tipo glucósido para *I. sonorae* y fructanos para *P. peltatum*, a los cuales se les han atribuido propiedades antioxidantes (Miró 1995; Tannin-Spitz y col., 2007). Por lo anterior, es posible que estos compuestos estén participando en revertir el daño oxidante que presentan los ratones con diabetes experimental, a través de los efectos observados sobre la actividad de la G6PDH hepática y su acción antioxidante sobre GSH y MDA. Por lo tanto, debido a dichas propiedades, las tres especies vegetales incluidas en el estudio, pueden ayudar a evitar las complicaciones inducidas por la diabetes.

## 9. CONCLUSIONES

1. Esta investigación apoya el uso de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* como hipoglucemiante e hipolipemiante en la medicinal tradicional mexicana.
2. El efecto antiinflamatorio de las tres especies vegetales estudiadas, provocó la disminución en la concentración de IL-6, TNF $\alpha$ -R1 y resistina e incrementó adiponectina.
3. Los resultados indican que el incremento sobre la concentración de insulina con *C. ficifolia*, no es mediada a través de los canales K<sub>ATP</sub>. Sin embargo, el efecto hipoglucémico de *I. sonorae* se podría explicar por el bloqueo registrado sobre éstos canales.
4. La administración diaria de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* estableció su efecto sobre enzimas del metabolismo de los carbohidratos, al disminuir la actividad de la G6Pasa y el incremento de la G6PD.
5. La administración de los extractos acuosos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* disminuyeron la concentración de MDA y aumentan GSH.

## 10. REFERENCIAS

Achenbach H, Horn K, Domínguez XA, Rombold C y Gómez-López E. 1993. Cucurbitanes y cucurbitanes-type glycosides from *Ibervillea sonora*. *Phytochem* 33: 437-445.

Acosta JL, Jiménez E, Juárez MA, Díaz JC. 2001. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J Ethnopharmacol* 77: 99-101.

American Diabetes Association. ADA. 2004. Nutrition principles and recommendations. *Diabetes Care* 27: 536-546.

Aguillón JC, Cruzat A, Cuenca J y Cuchacovich M. 2002. El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. *Rev. med. Chile.* 130: 1043-1050.

Alarcon-Aguilar FJ, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R, Gonzalez-Paredes B, Contreras CC, Roman-Ramos R. 2000. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids, and one polysaccharide fraction from *Psacalium decompositum* in mice. *J Ethnopharmacol.* 69:207-15.

Alarcon FJ, Campos AE, Xolalpa S, Hernandez E, Roman R. 2002a. Study of the hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonora* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biol* 40: 570-575.

Alarcon FJ, Hernandez E, Campos AE, Xolalpa S, Rivas JF, Vázquez LI, Roman R. 2002b. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol* 82: 185-9.

Alarcon FJ, Roman R, Flores JL, Aguirre. 2002c. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res* 16: 383-386.

Alarcon FJ, Roman R, Jiménez M, Reyes R, Gonzales B, Flores JL. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol* 55: 171-177.

Alarcon-Aguilar FJ, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejia S, Banderas-Dorantes TR, Jasso-Villagomez EI, Almanza-Perez JC, Blancas-Flores G, Zamilpa A, Diaz-Flores M, Roman-Ramos R. 2010. Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. *J Ethnopharmacol.* 132: 400-7.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1996. *Biología molecular de la célula*. Omega. España. pp 84-88, 704.

Alípio R. 2000. Oligossacarídeos e suas propriedades funcionais. *Food Ingredients* 7, 94-95.

Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99: 325-348.

Argaez-Lopez N, Wacher NH, Kumate-Rodriguez J, Cruz M, Talavera J, Rivera-Arce E, Lozoya X. 2003. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care* 26:2470.

Ashcroft FM, Gribble FM. 2000. Tissue specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K (ATP) channels. *J Diabetes Complications* 14: 192-6.

Ashfield R, Gribble F, Ashcroft S, Ashcroft F. 1999. Identification of the high affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K-ATP channel. *Diabetes* 48: 1341-1347.

Bergmeyer HU, *Methods in Enzymology*. Academic Press New York and London 1965, p 788-792

Bohinski R. 1991. *Bioquímica*. Addison-Wesley. Iberoamericana. Estados Unidos Americanos. pp 490-517

Brayden JE. 2002. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 312-6.

Bucay JW. 2008. *La plantas medicinales y las ciencias. Una visión multidisciplinaria*. Editado por Instituto Politécnico Nacional. Capítulo 20 pp 391.

Chattopadhyay RR. 1999. A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J Ethnopharmacol* 167:367-72.

Cheng AY, Fantus IG. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. (CMAJ) 18:213-226.

Committee Report. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.

Contreras WC, Román RR, Pérez C, Alarcón F, Zavala MA, Pérez S. 2005. Hypoglycemic activity of a new carbohydrate isolated from the roots of *Psacalium peltatum*. *Chem Pharm Bull* 53: 1408-1410.

Contreras C, Pérez S, Alarcón F, Román R. 2002a. Anti-hyperglycemic effect of *Psacalium peltatum*. *Proc West Pharmacol Soc* 45:134-6.

Contreras F, Romero B, Suárez N, González M, Fouilloux C, Guevara E, Betancourt MC, Torres D y Velasco M. 2002b. Receptores Sur y Sulfonilureas en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica (AVFT)* v.21 n.2.

Coopack S, Lant F, McIntosh S, Rodgers V. 1990. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *British J of Clin Pharmacol* 29: 673-684.

Cyrino FZ, Bottino DA, Coelho FC, Ravel D and Bouskela E. 2003. Effects of sulfonylurea on K<sub>ATP</sub> channel-dependent vasodilation. *J Diabetes Compl* 17:6-10.

Doyle ME, Egan JM. 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* 55:105-131.

Draznin B. 1994. *Molecular biology of diabetes*. Vol I Ed. Human Press, New Jersey, pp 303-332.

Edelstein SL, Knowler WC, Bain RP, Reubin A, Barret-Connor EL, Dowse GK, Haffner SM, Pettit DJ, Muller DC, Collins VR, Hamman RF. 1997. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM. *Diabetes* 46:701-710.

Estrada-Bernal A. 2002. Citocinas y activación endotelial. *Revista de Educación Bioquímica*. 21: 41-49.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, y Grodsky GM. 2002. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 23:599-622.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003a. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: S5-S20.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003b. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:3160-3167.

Flores-Saenz JL, Trujillo-Arriaga HM, Rivas-Vilchis JF, Mendez-Francisco JD, Alarcón-Aguilar, Roman-Ramos R. 2003. Crossover and double blind study with metformin and rosiglitazone in impaired glucose tolerance subjects. *Proc West Pharmacol Soc* 46:143-147.

Fonseca V, Kelley D, Cefalu W, Baron M, Purkayastha D, Nestler J, Hsia S, Gerich J. 2004. Hypoglycemic potential of nateglinide versus glyburide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 53:1331-5.

Freeman JS. 2012. Improving glucagon-like peptide-1 dynamics in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc* 112: S2-S6.

Gao ZG, Ye JP. 2012. Why do anti-inflammatory therapies fail to improve insulin sensitivity?. *Acta Pharmacol Sin*. 33:182-8

Guardiño-Ramírez ML, Delgado G. 2003. New eremophilanoids from the root of *Psacalium radulifolium*. Hypoglycemic, antihyperglycemic and anti-oxidant evaluations. *Rev Soc Mex* 47:160-166.

Gibson G.R., y Roberfroid M.B. 1995. "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics". *J Nutr*. 125: 1401-1412.

Goodman y Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol I, Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, pp 855-856.

Hamaguchi T, Hirose T, Asakawa H, Itoh Y, Kamado K, Tokunaga K, Tomita K, Masuda H, Watanabe N, Namba M. 2004. Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide. *Diabetes Res Clin Pract* 66 Suppl 1:S129-32.

Hernández E, Aguilar A, Aguilar L, Román R, Chávez AA, García LM, Flores JL, Alarcón FJ. 2002a. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proc. West. Pharmacol Soc* 45:118-124.

Hernández E, Campos AE, Alarcón FJ, Vázquez LI, Flores JL, Román R. 2002b. Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice. *Proc West Pharmacol Soc* 45:42-43.

Hernández E, Sepulveda E, Calzada F, Román R, Alarcón FJ. 2006. Acute toxicity and chemical fractionation guided by bioassay of dichloromethane extract of root from *Ibervillea sonorae*. En: Anuario de Investigación en Etnomedicina II. Ed. José F. Rivas Vilchis. UAM-I. pp. 45-53.

Hernández-Galicia E, Calzada F, Román-Ramos R y Alarcón-Aguilar FJ. 2007. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonorae* root: isolation and hypoglycemic activity. *Planta Med* 73:236-240.

Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867.  
<http://www.who.int/diabetes/en/>; WHO, 2003

<http://www.fao.org/docrep/T0646EOa.html> Consultada Mayo, 2012.

<http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/wereque.pdf> Consultada Mayo, 2012.

<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/PsacaliumPeltatum.html> Consultada Mayo, 2012.

Incoll LD, Bonnett GD. 1996. Fructans in the Compositae a short review. 401-413 In: CALIGARI, P. D. S., HIND, D. J. N. (eds). *Compositae: Biology & Utilization*. Proceedings of the International Composite Conference. Royal Botanic Gardens, Kew.

Jackson KG, Taylor GRJ, Clohessy AM, Williams CM 1999. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, inulin and glucose concentration in middle-aged men and women. *British Journal of Nutrition* 82: 23-30.

Jimenez-Estrada M, Merino-Aguilar H, Lopez-Fernandez A, Rojano-Vilchis NA, Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar FJ. 2011. Characterization and evaluation of the hypoglycemic effect of fructooligosaccharides from *Psacalium decompositum*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 8:1-12.

Jones RB, Dickinson DM, Anthony DM, Marita AR, Kaul, Buckett WR. 1997. Evaluation of BTS 67 582, a novel antidiabetic agent, in normal and diabetic rats. *British J of Pharmacol* 120: 1135-1143.

Kaku K, Inoue Y, Kaneko T. 1995. Extraprostatic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes Res Clin Pract (suppl)* 28: S105- S108.

Katzung BG. 1999. *Farmacología básica y clínica*. Ed. Manual moderno, México, pp 203, 791-812.

King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431.

Kim W y Egan JM. 2008. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews* 60: 470-512.

Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. 2005. Interleukin-6 and diabetes. *Diabetes* 54 (suplemento): S114-124.

Kumar Das S, Elbein SC. 2006. The genetic basis of type 2 diabetes. *Cellscience* 2:100-131.

Larner J. 2002. D-chiro-inositol--its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *Int J Exp Diabetes Res.* 3:47-60.

Lehninger AL. 1994. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* Omega.

Liss B, Roeper J. 2001. Molecular physiology of neural K-ATP channels. *Mol Membr Biol* 18: 117-127.

Litter M. 1998. *Farmacología experimental y clínica.* 7a. edición, ed. Ateneo, Argentina, pp 722.

Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2002. *Biología celular y molecular.* 4a. edición, ed. Médica Panamericana, México, pp 862-891, 923, 929-931.

Marles RJ, Farnsworth, NR.1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine.* 2:137-189.

McClenaghan N, Flatt P and Ball A. 2006. Actions of glucagon-like peptide-1 on KATP channel-dependent and -independent effects of glucose, sulphonylureas and nateglinide. *J. Endocrinol* (2006) 190, 889–896.

Marcy TR, Britton ML, Blevins SM. 2004. Second-Generation Thiazolidinediones and Hepatotoxicity. *Ann Pharmacother* 38:1419-1423.

Maritim AC, Sander RA and Watkins III JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Molecular Toxicol* 17:24-38

Mayer BD. 1991. *Diabetes mellitus diagnosis and treatment.* 3a. ed. Editorial Churchill Livingstone, Reino Unido. pp. 250.

Moore H, Summerbell C, Hooper L, Cruickshank K, Vyas A, Johnstone P, Ashton V, Kopelman P. 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD004097.

Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanashi S. 1999. Site specific DNA methylation and apoptosis induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol* 57:881-887.

Nagashima K, Takahashi A, Ikeda H, Hamasaki A, Kuwamura N, Yamada Y and Seino Y. 2004. Sulfonylurea y non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res Clin Prac* 66:S75-S78.

Nakaya H, Miki I, Seino S, Yamada K, Inagaki N, Suzuki M, Sato t, Yamada M, Matsushita K, Krachi Y, Arita M. 2003. Molecular and functional diversity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: the pathophysiological roles and potential drug targets. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122: 243-250.

Nichols CG, Koster JC. 2002. Diabetes and insulin secretion: whither K<sub>ATP</sub>? *Am J Physiol Encocrinol Metab* 283:E403-E412.

Niness KR. 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *Journal of Nutrition* 129, 402-406.

Park J, Rho HK, Kim KH, Choe SS, Lee YS and Kim JB. 2005. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Molecular and cellular biology*. 25: 5146-5157.

Pang S, Le Y. 2006. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol* 3:29-34.

Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F and Ascroft F. 2002. Beta-cell stimulus-secretion coupling: K<sup>+</sup>ATP channels on Ca<sup>+2</sup> sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 51: S368-S376.

Quast U, Cook N. 1989. In vitro and in vivo comparison of two K<sup>+</sup> channel openers, diazóxido and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* 1: 250-261.

Rodrigues B, Poucheret P, Battel ML, and McNeill JH. 1999. Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s) and dose dependency. In: *Experimental Models of Diabetes*, edited by McNeill JH. Boca Raton, FL: CRC. p. 3–19.

Román R, Lara A, Alarcón FJ, Flores JL. 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch of Med Res* 23: 105-109.

Roman-Ramos R, Almanza-Perez JC, Fortis-Barrera A, Angeles-Mejia S, Banderas-Dorantes TR, Zamilpa-Alvarez A, Diaz-Flores M, Jasso I, Blancas-Flores G, Alarcon-Aguilar FJ. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of a hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in streptozotocin-induced diabetes mice. *Am J Chinese Medicine* 40: 97-110.

Romo de Vivar A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Editorial Limusa. p.p. 72.

Ruhe RC, MacDonald RB. 2001. Use of antioxidant nutrients in the prevention and treatment of type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr* 20:363S-369S.

Salisbury FB, Ross CW. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamericana. Capítulo 11. pp 273.

Schauwen P y Hesselink MK. 2004. Oxidative capacity lipotoxicity and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1412-1417.

Schulze MB, Rimm EB, Shai I, Rifai N y Hu FB. 2004. Relationship between adiponectin and glycemic control, blood lipids, and inflammatory markers in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 1680-1687.

Silberberg SD, Van Breemen C. 1991. An ATP, calcium and voltage sensitive potassium channel in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 172:517-522.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. 2003. *Bioquímica*. Reverté. España. pp 425-461 y 551-559.

Stuart CA, Gilkison CR, Carlson RF, Stuart CA, Gilkison CR, Carlson RF. 1997. Effect of adding a sulfonylurea in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus previously well controlled with insulin. *Endocr Pract* 3:344-348.

Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-546.

Vijn I., Smeekens S. "Fructan: more than a reserve carbohydrate?", *Plant Physiol.*, Vol. 120, 1999, pp. 351-359.

Wang J, Sporns P, y Low NH. 1999. Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *J Agric Food Chem* 47: 1549-1557.

WHO. (World Health Organization) Department of noncommunicable disease surveillance. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva. WHO/NCD/NCS/99.2 pp 1-66.

WHO. (World Health Organization) Department of noncommunicable disease surveillance. 2003. Screening for type 2 diabetes. Report of World Health Organization and International Diabetes Federation meeting. WHO/NMH/MNC/03.1 pp 1-54.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R and King H. 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.

Wright EJR, Scism-Bacon JL, Glass LC. 2006. Oxidative stress on type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycemia. *J Clin Pract* 60:308-314.

Wu SY, Wang GF, Liu ZQ, Rao JJ, Lü L, Xu W, Wu SH, Zhang JJ. 2009. Effect of geniposide, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Acta Pharmacol Sin* 30: 202-208.

Xia T, Wang Q. 2006. D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozocin-diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 58:1527-1532.

Yap A, Nishiumi S, Yoshida K. 2007. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology*, 55, 103-108.

Zentella de Piña M, Saldaña Balmori Y. 1996. Papel fisiológico de los radicales libres. *BEB* 15:152-161.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Godyear LJ and Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Inv* 108:1167-1174.

Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG, Schalattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB and Goldman MH. 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. *J Biol Chem*. 279: 43940-43951.

## Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonorae* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings

[Influencia de dos Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché e *Ibervillea sonorae* Greene) sobre los canales de potasio sensibles a ATP en anillos aórticos de rata]

Tania Rosario BANDERAS-DORANTES<sup>1</sup>, Ruben ROMAN-RAMOS<sup>2</sup>, Alejandro ZAMILPA<sup>3</sup>,  
Rebeca GARCIA-MACEDO<sup>4</sup>, Margarita DIAZ<sup>1</sup>, María Guadalupe CAMPOS<sup>5</sup>,  
Jaime TORTORIELLO<sup>3</sup> & Francisco Javier ALARCON-AGUILAR<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Doctorate in Health and Biological Sciences, Metropolitan Autonomous University (UAM), Mexico City Mexico.

<sup>2</sup>Laboratory of Pharmacology, Department of Health and Biological Sciences, UAM, Mexico City, Mexico.

<sup>3</sup>Center of Biomedical Research of the South, Mexican Institute of Social Security (IMSS), Xochitepec, Morelos, Mexico.

<sup>4</sup>Unit of Medical Research in Biochemistry.

<sup>5</sup>Unit of Medical Research in Pharmacology, National Medical Center Century XXI, IMSS, Mexico City, Mexico.

Contactos | Contacts: Francisco Javier ALARCON-AGUILAR - E-mail address: [aaasj2@prodigy.net.mx](mailto:aaasj2@prodigy.net.mx)

### Abstract

*Cucurbita ficifolia* Bouché fruit containing D-chiro-inositol and *Ibervillea sonorae* Greene root containing cucurbitane-type glycosides are used to control diabetes in Mexico. Although the hypoglycemic effect of both plants has been demonstrated and some active compounds proposed, their mechanisms are still unknown. The aim of this study was to determine if the incubation with both aqueous extracts avoids the inhibition of contraction induced by phenylephrine similarly to glibenclamide in rat aortic rings. The hypoglycemic aqueous extracts of *C. ficifolia* and *I. sonorae* were characterized for their content of either D-chiro inositol or cucurbitanes respectively, and then we assayed the characterized extracts *in vitro* on the diazoxide-induced relaxation of rat aortic rings precontracted with phenylephrine, using as positive control glibenclamide. *I. sonorae* extract blocked the  $K_{ATP}$  channels in a concentration-dependent manner ( $p < 0.05$ ), whereas *C. ficifolia* extract had no effect on these channels. *I. sonorae* extract produces a hypoglycemic effect through a similar mechanism to sulphonylureas in this experimental model; however, hypoglycemic action of *C. ficifolia* extract should be explained by an independent  $K_{ATP}$  channels mechanism.

**Keywords:** Cucurbita ficifolia, Ibervillea sonorae, Cucurbitaceae, hypoglycemic plants, diabetes mellitus, vascular smooth muscle,  $K_{ATP}$  channels.

### Resumen

Los frutos de *Cucurbita ficifolia* conteniendo D-qui-ro-inositol y las raíces de *Ibervillea sonorae* conteniendo glucósidos tipo cucurbitano son empleados en el control de la diabetes en México. Aunque el efecto hipoglucémico de ambas plantas ha sido demostrado y se han propuesto algunos de sus compuestos activos, aún se desconoce su mecanismo de acción. El objetivo de este estudio fue determinar si la incubación con ambos extractos acuosos evita la inhibición de la contracción inducida por fenilefrina de manera similar a la glibenclamida en anillos aórticos de rata. Los extractos acuosos hipoglucémicos de *C. ficifolia* e *I. sonorae* fueron caracterizados en su contenido de D-qui-ro inositol o cucurbitanos, respectivamente y entonces fueron estudiados en un modelo *in vitro* en la relajación inducida por diazóxido en anillos aórticos previamente contraídos con fenilefrina, usando como control positivo glibenclamida. El extracto de *Ibervillea sonorae* bloqueó los canales  $K_{ATP}$  de manera dosis-dependiente ( $p < 0.05$ ), mientras que *Cucurbita ficifolia* no tuvo efecto en esos canales. El extracto de *I. sonorae* produce efecto hipoglucémico a través de un mecanismo similar al de las sulfonilureas en este modelo experimental; por su parte, la acción hipoglucémica del extracto de *C. ficifolia* debe ser explicado mediante un mecanismo independiente de los canales  $K_{ATP}$ .

**Palabras Clave:** Cucurbita ficifolia, Ibervillea sonorae, Cucurbitaceae, plantas hipoglucémicas, diabetes mellitus, músculo liso vascular, canales  $K_{ATP}$

Recibido | Received: March 8, 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: May 7, 2012.

Publicado en línea | Published online: November 30, 2012.

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** This research was partially supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden; the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, The Netherlands, through a grant to Francisco Javier Alarcon-Aguilar, PhD (Research Grant Agreement No. F/3338-2F); and by the PIFI2-PROMEP-SEP (Project P/CA-15-2006-35.53).

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** Tania Rosario Banderas-Dorantes, Ruben Roman-Ramos, Alejandro Zamilpa, Rebeca García-Macedo, Margarita Díaz, María Guadalupe Campos, Jaime Tortoriello, Francisco Javier Alarcón-Aguilar. 2012. Influence of two hypoglycemic Cucurbitaceae (*Cucurbita ficifolia* Bouché and *Ibervillea sonorae* Greene) on ATP-sensitive potassium channels in rat aortic rings. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 11(6): 510 – 519.

*C. ficifolia* - *Cucurbita ficifolia*;  $^{13}\text{C}$  NMR – Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy; DCI- *D*-chiro- inositol; GLP-1- glucagon-like peptide; HPLC – High Performance liquid chromatography; IMSSM – (Del español) Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico; *I. sonorae* – *Ibervillea sonorae*;  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels – ATP-sensitive potassium channels; KCOs –  $\text{K}^+$  channel opener; KRB - Krebs-Ringer bicarbonate solution; STZ – streptozotocin; SU -sulfonylurea; T2D - type 2 diabetes; VSM - vascular smooth muscle.

## INTRODUCCIÓN

ATP-sensitive potassium channels ( $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels) in pancreatic  $\beta$ -cells are biological sensors of blood glucose levels, which regulate insulin secretion through modulation of membrane excitability (Akrouh *et al.*, 2009). These channels are expressed in distinct muscle tissues, including skeletal, cardiac (Noma, 1983), visceral, and especially in the vascular smooth muscle (VSM), regulating distinct physiological functions (Olson and Terzic, 2010; Gribble and Reimann, 2003).

In the islets of Langerhans, when the extracellular glucose concentration is low,  $\beta$ -cell metabolism is low, and the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels are open. As a result, the cell membrane is hyperpolarized, causing voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels to remain closed. Under these conditions, no insulin is released. If the extracellular glucose concentration rises, the glucose is taken up by the  $\beta$ -cell and metabolized, generating ATP at the expense of MgADP, thereby closing  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. The closed potassium channels cause membrane depolarization, opening of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels,  $\text{Ca}^{2+}$  influx and insulin secretion (Clark and Proks, 2010). The  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels further contribute to glucose homeostasis by controlling glucose uptake in skeletal muscle and by controlling GLP-1 (glucagon-like peptide) secretion from L-cells in the gut (Clark and Proks, 2010).

The sulfonylurea (SU) derivatives, such as glibenclamide and diazoxide, act throughout  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. Particularly, glibenclamide is a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel blocker and it is considered to be hypoglycemic agent (Koster *et al.*, 2005; Clark and Proks, 2010), also it blocks  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel at extra-pancreatic sites such as liver, skeletal, heart and vascular smooth muscle (Luizi and Poza, 1997). In contrast, diazoxide is a potent  $\text{K}^+$  channel opener (KCOs), like pinacidil and cromakalim (Miura and Miki, 2003). All these agents represent the most commonly used compounds in the search for new  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel blockers, using VSM as

an *in vitro* model (Campos *et al.*, 2009; Remedi and Koster, 2010).

In addition to antidiabetic agents, medicinal plants are also used to control diabetes mellitus in Mexico. Such is the case of the mature fruit of *Cucurbita ficifolia* Bouché (*C. ficifolia*), popularly known like “chilacayote,” and the root of *Ibervillea sonorae* Greene (*I. sonorae*), popularly known like “wareque”; two Cucurbitaceae species ingested as antidiabetic remedies, both prepared as an infusion (Aguilar *et al.*, 2006; Figueroa, 2009).

The phytochemical studies performed in *C. ficifolia* have showed that the fruit contains *D*-chiro-inositol (DCI), which has been proposed as one of the main active compounds in the aqueous extract (Xia and Wang, 2006a); in contrast, *I. sonorae* contains cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides and aglycons (Achenbach *et al.*, 1993). In addition, eleven monoglycerides and five fatty acids in an *Ibervillea sonorae* dichloromethane extract were proposed as the compounds that induce the anti-hyperglycemic effect (Hernandez-Galicia *et al.*, 2007).

In previous pharmacological studies, the hypoglycemic effects of both *C. ficifolia* and *I. sonorae* were demonstrated in normal and alloxan-induced diabetes rodents (Roman-Ramos *et al.*, 1991, 1992; Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002a, 2002b, 2005), suggesting that this activity is mediated by incremented insulin levels (Xia and Wang, 2006b). However, the mechanisms underlying this activity are yet unknown. Therefore, the aim of this study was to see if the incubation with aqueous extracts of *C. ficifolia* and *I. sonorae* beat down the inhibition of contraction induced by phenylephrine similarly to glibenclamide in rat aortic rings, which eventually may be associated with an rise in the secretion of insulin by the pancreatic  $\beta$ -cells in a similar manner to hypoglycemic SU derivatives, such as glibenclamide.

## MATERIAL AND METHODS

### *Plant material*

Fresh mature fruits of *C. ficifolia* with diameters of 18–20 cm were gathered in San Bartolo el Chico, Acolman Estado de Mexico, during October, 2010. Roots of *I. sonorae* with diameters of 25–28 cm were gathered in Carbo Sonora, Mexico, during April, 2011. Botanical identification was performed by botanical experts from the Mexican Institute of Social Security, Mexico (IMSSM) Herbarium (Voucher Specimen Num. 11119 for *C. ficifolia* and 14184 for *I. sonorae*).

The seed-free endocarp of the fruit of *C. ficifolia* and the epidermis-free root of *I. sonorae* were used.

Immediately after collection, the vegetal material was dried on a flat surface in dark conditions and with constant ventilation. The seed-free endocarp of *C. ficifolia* and the epidermis-free root of *I. sonorae* were dried at room temperature and ground using a 2-mm mesh in a Model 4 Wiley electric mill.

#### Extract preparation

In accordance with traditional use of these plants, an aqueous extract was obtained. Ground material of *C. ficifolia* (250 g) and *I. sonorae* (500 g) was steeped in boiling water (2 L and 1 L, respectively) for 1 h and left to cool to room temperature; the supernatant was filtered and freeze-dried.

#### HPLC analysis of the extracts

##### Quantification of D-chiro-inositol in the aqueous extract of *C. ficifolia*

HPLC analysis of the *C. ficifolia* fruit extract was performed using a liquid chromatographic system consisting of a Waters 2695 separation module and a Waters 2697 index refractive detector (Waters; Milford, MA, USA). A LiChrospher™ NH<sub>2</sub> 5 μm column (4 x 250 mm, 100 Å) and the mobile phase of an isocratic mixture of CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (90:10) were used. The flow rate was maintained at 1 mL/min for

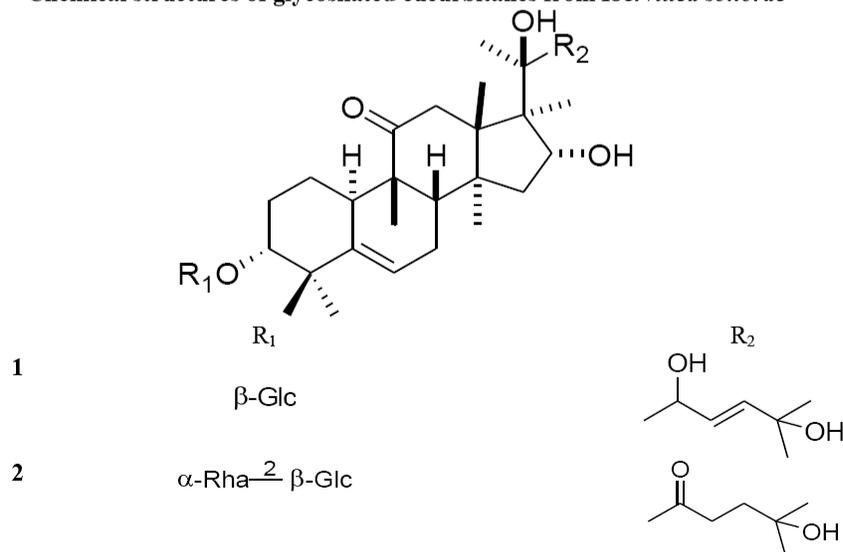
10 min. Five concentrations (100, 200, 400, 800 and 1000 μg/mL, 20 μL of each concentration) of DCI (≥ 95%) were injected using the same HPLC method.

##### Quantification of cucurbitane-type glycosides in the aqueous extract of *I. sonorae*

HPLC analysis of *I. sonorae* was performed using a chromatographic system comprising a Waters 2695 separation module and a Waters 2996 photodiode array detector. A LiChroCART-LiChrospher™ RP-18 5-μm column (4 x 125 mm, 100 Å) was used as the solid phase, and an isocratic CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (70:30) mixture was used as the mobile phase. Five concentrations (50, 100, 200, 400 and 800 μg/mL) of each glycosylated cucurbitane, (**1**) ((22S)-3α-(β-D-Glucopyranosyloxy)-16α,20,22,25-tetrahydroxy-(10α)-cucurbita-5,23*t*-dien-11-one) and (**2**) 16α,20,25-Trihydroxy-3α-(2-O-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranosyloxy)-(10α)-cucurbit-5-ene-11,22-dione, previously isolated from *I. sonorae*, were injected (20 μL) in triplicate. Compound **1** displayed a retention time of 2.2 min, whereas that of compound **2** was of 3.7 min (Figure 1).

The structural identification of these compounds was performed by direct comparison of <sup>13</sup>C NMR data with those previously described in the literature (Achenbach *et al.*, 1993).

**Figure 1**  
Chemical structures of glycosylated cucurbitanes from *Ibervillea sonorae*



### Animals

Male adult CD-1 strain mice (n=30) weighing 30-40 g and male Wistar rats (n = 24) weighing 270 - 300 g were given free access to water and food. All experimental animals were maintained with alternating 12-hour periods of light and dark. The handling of laboratory animals was performed in agreement with the statutes of the ICCUA (Institutional Committee for the Care and Use of the Animals) and the Official Mexican Rule (NOM-062-Z00-1999, revised 2001).

### Influence of *C. ficifolia* and *I. sonorae* on glycemia and triglyceridemia of streptozotocin-induced diabetic mice

One study in streptozotocin-induced diabetic mice was designed, to verify if the gathered materials in the present investigation conserve the hypoglycemic effects that previously were reported. After an initial acclimation period (7 days), normal mice were injected with streptozotocin (STZ, 136.5 mg/kg) dissolved in a 0.1 M sodium citrate buffer solution at pH 4.5. Blood glucose levels were determined (hydrogenase method, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) seven days after STZ administration. In these conditions, all of the streptozotocin-treated mice developed experimental diabetes, with glycemic values between 350 - 400 mg/dL. Five groups of eight animals each were formed: Group 1, normal mice; Group 2, control diabetic mice, which received injections of isotonic saline solution (ISS) alone (4 ml/kg/day); Group 3, diabetic mice treated with pioglitazone (0.64 mg/kg, Eli Lilly Lab, USA), an insulin sensitizer that reduces hyperglycemia and hypertriglyceridemia in diabetes; Groups 4 and 5 of diabetic mice that received 250 mg/kg/day of both *C. ficifolia* extract (equivalent to 0.19 mg/kg/day of DCI) and *I. sonorae* extract (12.63 mg/kg/day and 19.78 mg/kg/day of compound **1** and compound **2**, respectively). All treatments were administered *per os* for 30 days. At the end of the treatment, blood samples for determination of glycemia were collected from the tail veins of animals with free access to food. Other blood samples were obtained from the orbital sinuses of mice anesthetized with an intra-peritoneal (ip) injection of sodium pentobarbital (25.2 mg/kg) and were collected in Eppendorf tubes to determine triglyceridemia with the Reflotron System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

### Effect of *Cucurbita ficifolia* and *Ibervillea sonorae* extracts on $K_{ATP}$ channels in rat thoracic aorta

Normal male rats were euthanized with ip injections of sodium pentobarbital (75.6 mg/kg). The thoracic aorta was isolated and excess fat and connective tissue was removed for each rat. Rings with intact endothelium, approximately 4 mm long, were cut and placed into an isolated tissue bath (5 mL) in a Krebs-Ringer bicarbonate solution (KRB) with 120 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 11 mM glucose, pH 7.2-7.4 (Sigma Chemical Co, St Louis Mo, USA).

Two stainless steel hooks were inserted into the lumen of the isolated aortic rings; one was fixed, and the other was connected to a forced displacement transducer. The contractile activity was registered with transducer (tension 2 g) using Biopac equipment (Biopac System, Santa Barbara, California). The aorta rings were each washed for 15 min with KRB solution, and a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> was bubbled through the solution for 1 h to stabilize the response.

The rings were repeatedly washed with KRB solution to assess the viability of aortic tissues; these tissues were depolarized with a solution of 60 mM KRB-K60, which was identical in composition to the KRB except that the KRB-K solution contained 64.7 mM NaCl and 60 mM KCl instead of 120 mM NaCl and 4.7 mM KCl. To determine the adequate concentrations of *C. ficifolia* and *I. sonorae* extracts for these experiments, the rings were washed for 15 min to recover the basal values and were then incubated for 30 min with different concentrations of the extracts (1 - 300 µg/mL). Finally, the rings were depolarized with KRB-K60 until the depolarization reached a plateau. The concentrations of the extracts were considered innocuous when the tissue response was similar before and after the incubation; these concentrations were used in the study.

Phenylephrine at a concentration of  $3.2 \times 10^{-7}$  M in EtOH/DMSO, 2.5:1 was added to new aortic rings in the bath to induce a sustained contraction; cumulative doses of diazoxide were added (1, 1.8, 3.2, 5.6 and  $10 \times 10^{-5}$ ) to inhibit phenylephrine-induced contraction until a plateau had been reached. These rings were incubated for 30 min with the selected concentrations of the extracts of *C. ficifolia* or *I. sonorae* (1, 3, 10 and 30 µg/mL, using a different ring

for each concentration) or with glibenclamide ( $1 \times 10^{-5}$  M) in ethanol/dimethylsulfoxide (EtOH/DMSO) 2.5:1 or the vehicle (EtOH/DMSO). After the incubation, the phenylephrine-diazoxide curve was repeated to compare the effects of aqueous extracts of *C. ficifolia* or *I. sonorae* against the effects of the standard drug (glibenclamide). Final concentrations of ethanol and DMSO in the bath did not exceed of 0.25 % to 0.1 %, respectively, and proved to be innocuous for the tissues.

#### Data analysis

Results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Differences among groups were established by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer Multiple Comparison *post-hoc* test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All statistics were computed using the NCSS 2000 software.

The relaxation effect of diazoxide was expressed as a percentage of the contraction induced by  $3.2 \times 10^{-7}$  M phenylephrine (mean  $\pm$  SD). When the tension of the tissue returned to basal values, the relaxation was considered to reach 100%. The  $R_{max}$  and  $IC_{50}$  values for each concentration-response curve were calculated using a non-linear regression analysis with GraphPad Prism v4.0 for Windows (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

## RESULTS

The yields of aqueous extracts were 24.1% (*C. ficifolia*) and 37.4% (*I. sonorae*).

#### Quantification of D-chiro-inositol and cucurbitane-type glycosides by HPLC

The standard compound, DCI, displayed a retention time of 8.6 min with a linear calibration curve ( $R^2 = 0.99$ ). The injection of the *C. ficifolia* extract (20  $\mu$ L, 2 mg/mL), exhibited data that corresponded to a DCI concentration of 0.76 mg/g of extract.

The standard curve was linear ( $R^2 = 0.99$ ), and the *Ibervillea sonorae* extract (20  $\mu$ L, 4 mg/mL) was injected in triplicate using the described chromatographic quantitative method. One gram of the *I. sonorae* aqueous extract yielded 50.5 mg of compound **1** and 79.1 mg of compound **2**.

#### Effects of the aqueous plant extracts on blood glucose and triglyceride levels in streptozotocin-induced diabetic mice

The changes in blood glucose and triglyceride levels in normal and control diabetic (STZ control) groups are shown in Table 1. The glucose and triglyceride levels remained unchanged in the normal group. Both values were significantly higher in the STZ control. Pioglitazone significantly diminished the glucose and triglyceride levels compared with STZ control ( $p < 0.05$ ). The administration of *C. ficifolia* (0.19 mg/g of DCI) or *I. sonorae* (12.63 mg/g of compound **1** and 19.78 mg/g of compound **2**) significantly diminished glucose and triglyceride levels against the STZ control group ( $p < 0.05$ ).

**Table 1**  
Effect of *Cucurbita ficifolia* and *Ibervillea sonorae* extracts on blood glucose levels and triglycerides in streptozotocin (STZ)-induced mice

	Glucose (mg/dL)		Triglycerides (mg/dL)	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
Normal	105.16 $\pm$ 16.49	110.67 $\pm$ 21.41	80.51 $\pm$ 20.5	83.78 $\pm$ 25.71
Control (STZ)	368.21 $\pm$ 15.70	372.80 $\pm$ 21.85 <sup>a</sup>	270.04 $\pm$ 7.88	274.14 $\pm$ 6.44 <sup>a</sup>
Pioglitazone	357.45 $\pm$ 11.24	156.25 $\pm$ 16.80 <sup>b</sup>	262.31 $\pm$ 9.20	70.00 $\pm$ 10.00 <sup>b</sup>
<i>C. ficifolia</i>	372.22 $\pm$ 12.10	148.33 $\pm$ 25.18 <sup>b</sup>	271.23 $\pm$ 5.73	97.81 $\pm$ 17.87 <sup>b</sup>
<i>I. sonorae</i>	365.28 $\pm$ 13.79	197.80 $\pm$ 22.79 <sup>b</sup>	265.47 $\pm$ 8.24	159.66 $\pm$ 26.49 <sup>b</sup>

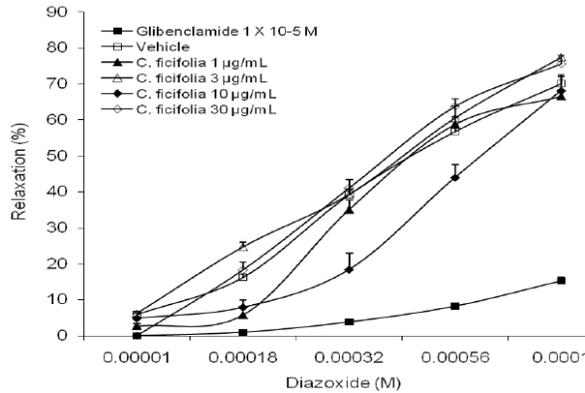
Data represent mean  $\pm$  standard deviation (n = 8). <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs Normal group; <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs Control group.  
Normal group: Healthy mice  
Control group: Diabetic mice by streptozotocin.

**Effects of the plant extracts on diazoxide-induced relaxation in rat thoracic aorta**

Figures 2 and 3 show that glibenclamide produced a relaxation of 18.32% of the phenylephrine-precontracted aortic rings, whereas incubation with the

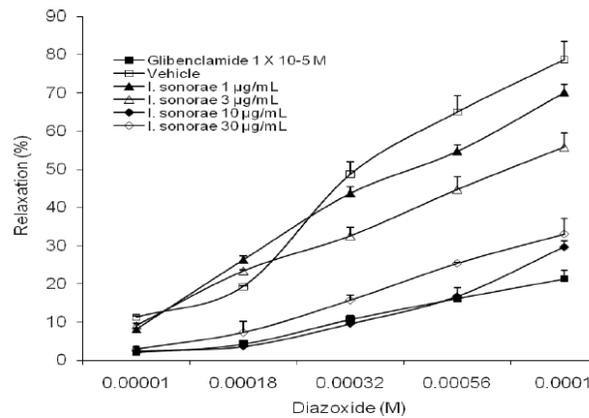
vehicle alone induced a relaxation of 74.41%, as shown in Table 2. The response maximum ( $R_{max}$ ) of glibenclamide-treated group was significantly lower than that of the vehicle-treated group ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2**  
**Effect of *Cucurbita ficifolia* on the diazoxide-induced relaxation of aortic rings pre-contracted with phenylephrine ( $3.2 \times 10^{-7}$  M).**



Data are mean of six experiments; vertical bars represent S.D.

**Figure 3**  
**Effect of *Ibervillea sonorae* on the diazoxide-induced relaxation of aortic rings pre-contracted with phenylephrine ( $3.2 \times 10^{-7}$  M).**



Data are mean of six experiments; vertical bars represent S.D.

The effects of *C. ficifolia* are shown in Figure 2. The different concentrations of the *C. ficifolia* aqueous extract did not induce relaxation of the pre-contracted tissues ( $p > 0.05$ ), without changes in the  $R_{\max}$  and  $IC_{50}$  in relation to the vehicle (Table 2).

In contrast, the *I. sonorae* aqueous extract (10 and 30  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited the diazoxide-induced relaxation in thoracic aorta rings (29.71% and 33.12%, respectively). This effect was similar to the effect of glibenclamide (18.32%), as they exhibited similar  $R_{\max}$  and  $IC_{50}$  values (Figure 3 and Table 2).

**Table 2**  
Relaxation response of rat aortic rings precontracted with phenylephrine to diazoxide in the presence of *C. ficifolia* and *I. sonorae*

Concentration	Treatment	$IC_{50}$	$R_{\max}$
1 $\mu\text{g/mL}$	<i>C. ficifolia</i>	$2.90 \pm 0.85$	$77.46 \pm 1.73$
	<i>I. sonorae</i>	$3.32 \pm 0.54$	$70.27 \pm 2.01$
3 $\mu\text{g/mL}$	<i>C. ficifolia</i>	$2.70 \pm 0.96$	$75.55 \pm 1.96$
	<i>I. sonorae</i>	$2.51 \pm 0.04$	$55.84 \pm 3.73$
10 $\mu\text{g/mL}$	<i>C. ficifolia</i>	$3.20 \pm 0.44$	$66.52 \pm 4.45$
	<i>I. sonorae</i>	$6.81 \pm 0.6^a$	$33.10 \pm 1.59^a$
30 $\mu\text{g/mL}$	<i>C. ficifolia</i>	$3.00 \pm 0.22$	$68.12 \pm 2.34$
	<i>I. sonorae</i>	$5.73 \pm 0.74^a$	$29.71 \pm 4.07^a$
( $10^{-5}\text{M}$ )	Glibenclamide	$8.15 \pm 3.86^a$	$18.32 \pm 1.58^a$
2.5:1	Vehicle	$2.80 \pm 0.77$	$74.41 \pm 3.36$

Data represent mean  $\pm$  standard error (n=6 for *C. ficifolia* and *I. sonorae*; n=12 for glibenclamide and Vehicle groups).

$IC_{50}$ , expressed like concentration ( $1 \times 10^{-5}\text{M}$ ).

$R_{\max}$ , expressed like percentage.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  vs Vehicle.

## DISCUSSION

In previous studies, it was shown that administration of *C. ficifolia* and *I. sonorae* caused significant reductions in both glucose and triglyceride levels in alloxan-induced diabetic rodents. The median lethal dose in normal mice ( $LD_{50}$ , *per os*) calculated for *C. ficifolia* was 3,689 mg/kg (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002b), whereas for *I. sonorae* the median  $LD_{50}$  was 2,158 g (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002a). In our study, a dose of 250 mg/kg of *C. ficifolia* and *I. sonorae* extracts significantly reduced glucose and triglyceride levels in streptozotocin-induced diabetic mice. After 30 days of treatment with these extracts, no mice exhibited any side effects such as diarrhea, decreased motor activity or significant weight changes. No

macroscopic alterations in the liver, heart, lungs or kidneys were observed in any group. These results confirm the reproducibility of the hypoglycemic effects of both Cucurbitaceae in distinct diabetes models. In fact, the model of diabetes induced by administration of STZ is considered a best model to generate a diabetes most stable and lower severe that with alloxan (McNeill, 1999).

Therefore, our investigation represents the first report of the hypoglycemic effect of *I. sonorae* in this model.

The principal contribution of this study was investigate a possible mechanism of action of *C. ficifolia* and *I. sonorae* aqueous extracts as blockers of the  $K_{ATP}$  channels *in vitro*, using activators and

inhibitors of  $K_{ATP}$  channels in VSM, such as diazoxide and glibenclamide, respectively.

The results showed that the cucurbitane-characterized extracts from *I. sonorae* inhibited the relaxation of phenylephrine-precontracted thoracic aorta induced by diazoxide. The aqueous extract of the *Ibervillea sonorae* (10  $\mu\text{g}$  corresponding to  $5 \times 10^{-4}$  M and  $7 \times 10^{-4}$  M, and 30  $\mu\text{g}$  corresponding to  $1.5 \times 10^{-3}$  M and  $2.37 \times 10^{-3}$  M of compounds **1** and **2**, respectively) produced a similar response to that observed with glibenclamide in rat thoracic aorta, which was included as a positive control in the *in vitro* study. Like glibenclamide, which is a non-selective  $K_{ATP}$  channels blocker *I. sonorae* might act as a modulator of the insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells; nevertheless, additional studies are needed to confirm this hypothesis. *I. sonorae* aqueous extract blocks the  $K_{ATP}$  channels only at concentrations of 30 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A lower percentage of inhibition (29.71%) was observed at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , an effect that may be explained by the presence of other compounds in the extract, such as alkaloids, glycosides, flavones, steroidal saponins (charantins), sterols, phenolics, cucurbitacin triterpenes and other tetracyclic triterpenes, as well as insulin-like peptides reported in Cucurbitaceae (Marles and Farnsworth, 1995). Interactions between these compounds on these  $K_{ATP}$  channels or other receptors could dampen the effect of *I. sonorae*.

In contrast, the aqueous extract of *C. ficifolia* was characterized to determine its DCI content, and it did not show any influence on  $K_{ATP}$  channels in rat thoracic aorta. This lack of effect can be attributed to the conformation of the subunits of the  $K_{ATP}$  channel: the pore-forming Kir subunit and the regulatory subunit of the sulfonylurea receptor SUR. Kir 6.1 and SUR 2B constitute the VSM-type  $K_{ATP}$  channel, whereas pancreatic  $\beta$ -cells have Kir 6.2 and SUR 1 (Nagashima *et al.*, 2004). However, both glibenclamide and *I. sonorae* have affinity by both conformations. In fact, it has been reported that all the SU derivatives have an unselective activity on these  $K_{ATP}$  channels, excepting tolbutamide that is selective uniquely to pancreatic  $\beta$ -cells  $K_{ATP}$  channels.

On the other hand, DCI is found in *C. ficifolia* fruit (Xia and Wang, 2006b), and when it is ingested, it may increase the activity of insulin. DCI is an important mediator of insulin's effects; it has classically been found in plants, insects and, in smaller relative quantities in animal tissues, including the human placenta, human urine, uremic serum and blood. DCI has been identified with myo-inositol in

the glycosyl phosphatidyl inositol lipid (GPI) fraction from H35 hepatoma rat cells. A pattern of increased myo-inositol and decreased DCI excretion in urine and blood has been observed in patients with type 2 diabetes (T2D), suggesting that T2D patients do not produce enough DCI and therefore exhibit a decrease in insulin sensitivity (Larner, 2002). As observed by Larner (2002), doses of DCI (1-10 mg/kg) decrease hyperglycemia (50%), preventing glucosamine-induced peripheral insulin resistance but do not affect hepatic glucose output; its mechanism is explained by initial incorporation into the glycosyl phosphatidyl inositol lipid precursor store and its subsequent release by phospholipases regulated by insulin (Larner, 2002). In addition, it has been demonstrated that GLP-1, a hormone released into the circulation from the gut after meal ingestion, might modulate  $K_{ATP}$  channel activity through a mechanism independent of insulin secretion. The proposed mechanisms include protein kinase-dependent and kinase-independent mechanisms, which may be modulated by incretins (McClenaghan *et al.*, 2006). Thus, the hypoglycemic activity of *C. ficifolia* could be explained by this mechanism, with no effects on VSM.

Cucurbitanes and cucurbitane-type glycosides are found most frequently in the *Cucurbitaceae* family and are currently recognized for their anti-cancer activities and their wide range of *in vitro* and *in vivo* pharmacological effects, such as purgative, anti-inflammatory, anti-fertility, hepatoprotective, anti-microbial, anthelmintic and antihyperglycemic effects (Chen *et al.*, 2005; Paduch *et al.*, 2007). It has been shown that stevioside and aglucon steviol potentiate insulin secretion from isolated mouse islets in a dose- and glucose-dependent way.

In this research, only concentrations between 10 and 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were used because only this range of concentrations produced the maximum inhibition of relaxation in thoracic aorta rings and there was no statistically significant difference between 10 and 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of *I. sonorae*.

#### CONCLUSION

This study provides additional support to the popular use of preparation of *C. ficifolia* and *I. sonorae* to treat diabetes mellitus in traditional Mexican medicine. This study also diminishes the possibility that the effect on insulin levels reported for *C. ficifolia* (Xia and Wang, 2006b) is mediated through the  $K_{ATP}$  channels and suggests that the hypoglycemic effect of *I. sonorae* is mediated directly through these channels. It is necessary to continue studying the extract of *I. sonorae* in isolated pancreatic  $\beta$ -cells to investigate

whether blocking is achieved through the SUR or Kir subunit of  $K_{ATP}$  channels.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was partially supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden; the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, The Hague, The Netherlands, through a grant to Francisco Javier Alarcon-Aguilar, PhD (Research Grant Agreement No. F/3338-2F); and by the PIFI2-PROMESEP-SEP (Project P/CA-15-2006-35.53). We are grateful to Deyanira Ojeda Ramirez, PhD, and Atilano Gutierrez Carrillo, PhD, for spectroscopic determinations. We are grateful to The Gonzalo Rio Arronte and IMSS Foundations.

#### REFERENCES

- Achenbach H, Horn K, Dominguez XA, Rombold C, Gomez Lopez EG. 1993. Cucurbitanes and cucurbitanes-type glycosides from *Ibervillea sonora*. **Phytochem** 33: 437 - 445.
- Aguilar Contreras A, Celso Fantini A, Martinez Balleste A. 2006. **Riquezas del bosque: frutas, remedios y artesanias en America Latina**, Chap. 3. Semillas, raíces y cogollos. Xolalpa Molina S y Aguilar Contreras A. Edited by Lopez C, Shanley P, Cronkleton MC. El Pais Publications. Bolivia.
- Akrouh A, Halcomb SE, Nichols CG, Sala-Rabanal M. 2009. Molecular Biology of  $K_{ATP}$  Channels and Implications for Health and Disease. **Life** 61: 971 - 978.
- Alarcon-Aguilar FJ, Calzada-Bermejo F, Hernandez-Galicia E, Ruiz-Angeles C, Roman-Ramos R. 2005. Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* roots extracts-II. **J Ethnopharmacol** 97: 447 - 452.
- Alarcon-Aguilar FJ, Campos-Sepulveda AE, Xolalpa-Molina S, Hernandez-Galicia E, Roman-Ramos R. 2002a. Hypoglycemic activity of *Ibervillea sonora* roots in healthy and diabetic mice and rats. **Pharm Biol** 40: 570 - 575.
- Alarcon-Aguilar FJ, Hernandez-Galicia E, Campos-Sepulveda AE, Xolalpa-Molina S, Rivas-Vilchis JF, Vazquez-Carrillo L, Roman-Ramos R. 2002b. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. **J Ethnopharmacol** 82: 185 - 189.
- Campos MG, Oropeza M, Torres-Sosa C, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R. 2009. Sesquiterpenoids from antidiabetic *Psacalium decompositum* block ATP sensitive potassium channels. **J Ethnopharmacol** 123: 489 - 493.
- Chen JC, Chiu MH, Nie RL, Cordell GA, Qiu SX. 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Nat Prod Rep** 22: 386 - 399.
- Clark, R. and P. Procks. 2010. ATP-sensitive potassium channels in health and disease. **Adv Exp Med Biol** 654: 165 - 192.
- Figuerola Hernández JL. 2009. Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. **Rev Dig Univ** 10: 1-12. <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art55/art55.pdf>  
Consulted October 22, 2012
- Gribble FM, Reimann F. 2009. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. **Diabetologia** 46: 875 - 891.
- Hernandez-Galicia E, Calzada F, Roman-Ramos R, Alarcon-Aguilar FJ. 2007. Monoglycerides and fatty acids from *Ibervillea sonora* root: Isolation and hypoglycemic activity. **Planta Med** 73: 236 - 240.
- Koster JC, Permutt MA, Nichols CG. 2005. Diabetes and insulin secretion. The ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$ ) connection. **Diabetes** 54: 3065 - 3072.
- Larner J. 2002. D-chiro-inositol- Its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. **Int J Exp Diabetes Res** 3: 47 - 60.
- Luizi L, Poza G. 1997. Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action. **Acta Diabetologica** 34: 239 - 244.
- Marles RJ, Farnsworth NR. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine** 2: 137 - 189.
- McClenaghan NH, Flatt PR, Ball AJ. 2006. Actions of glucagon-like peptide-1 on  $K_{ATP}$  channel-dependent and -independent effects of glucose, sulphonylureas and nateglinide. **J Endocrinol** 190: 889 - 896.
- McNeill JH. 1999. **Experimental models of diabetes, Chap 1. Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s) and dose dependency**. Rodriguez B, Poucheret P, Battell ML, McNeill JH. Edited by CRC Press LLC, Florida, USA.
- Miura T, Miki T. 2003. ATP-sensitive  $K^+$  channel openers: old drugs with new clinical benefits

- for the heart. **Curr Vasc Pharmacol** 3: 251 - 258.
- Nagashima K, Takahashi A, Ikeda H, Hamasaki A, Kuwamura N, Yamada Y, Seino Y. 2004. Sulfonylureas and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. **Diabetes Res Clin Pract** 66: 75 - 78.
- Noma A. 1983. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. **Nature** 305: 147 - 148.
- Olson TM, Terzic A. 2010. Human K(ATP) channelopathies: diseases of metabolic homeostasis. **Pflügers Arch** 460: 295 - 306.
- Paduch R, Kandefer-Szerzen M, Trytek M, Fiedurek J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** 55: 315 - 327.
- Remedi MS, Koster J. 2010. K(ATP) channelopathies in the pancreas. **Pflügers Arch** 460: 307 - 320.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Partida-Hernandez G, Lara-Lemus A, Alarcon-Aguilar F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. **Arch Invest Med (Mex)** 22: 87 - 93.
- Roman-Ramos R, Lara-Lemus A, Alarcon-Aguilar FJ, Flores-Saenz JL. 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. **Arch Med Res** 23: 105 - 109.
- Xia T, Wang Q. 2006a. D-chiro-inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycemic role in streptozotocin-diabetic rats. **J Pharm Pharmacol** 58: 1527 - 1532.
- Xia T, Wang Q. 2006b. Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Fitoterapia** 77: 530 - 533.