



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**“Inhibición de la gluconeogénesis hepática
por tres plantas hipoglucemiantes”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

LORENA MENDIOLA ALMARAZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO

MÉXICO, D.F.

MES, AÑO
FEBRERO, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Septiembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **MENDIOLA ALMARAZ LORENA** con número de cuenta **97172350** con la tesis titulada **"INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS HEPÁTICA POR TRES PLANTAS HIPOGLUCEMIANTES."**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
Vocal: DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE
Secretario: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
Suplente: DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ
Suplente: DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de febrero de 2009.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la beca otorgada por medio del programa de “Fomento a la Graduación de los Alumnos de Posgrado de la UNAM” para la elaboración de esta tesis.

A CONACyT por el apoyo financiero parcial a este proyecto (proyecto AC-2006-52075 y proyecto 000000000079910). Por el apoyo brindado a través del programa “Becas Mixtas” para realizar la estancia de investigación de tres meses en la Universidad de Bonn, Alemania (Mayo-Julio de 2009). Así como por la beca recibida para la realización de los estudios de maestría (Programa de Becas Nacionales).

A DGAPA y PAPIIT (IN202607) por haber financiado parcialmente este trabajo.

A PAEP por la beca recibida por medio del programa “Apoyo Económico para la Asistencia de Investigación (Internacional)” otorgada para la realización de la estancia de investigación en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania.

Especialmente a los miembros de mi Comité Tutorial:

Dr. Adolfo Andrade Cetto.

Dra. María Cristina Revilla Monsalve.

Dr. René de Jesús Cárdenas Vásquez.

Agradecimientos especiales

Al Dr. Adolfo Andrade-Cetto por darme la oportunidad de realizar este proyecto.

A la Dra. María Cristina Revilla Monsalve por sus aportaciones a este trabajo.

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por su paciencia, apoyo y sus grandes aportaciones durante la realización de este trabajo, en especial en las pruebas *in vitro*.

Al M. en C. Eddy Cuauhtémoc Martínez Zurita por sus enseñanzas, su paciencia, su importante colaboración en la elaboración de las pruebas de tolerancia a piruvato y la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero por la revisión de este trabajo y las grandes aportaciones que hizo al mismo.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz por la revisión de este trabajo.

Al Dr. Helmut Widenfeld por el apoyo y las aportaciones realizadas a este trabajo en la parte de fitoquímica, tanto en México como en Bonn, Alemania.

Al personal del bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM por su apoyo en el manejo de los animales utilizados en este trabajo:

M.V.Z. Mario J. Soriano Bautista

Biol. Dora Maria Salazar Castelo

Biol. María Isabel Antunez de la Rosa

M. en C. Agustin Carmona Castro

Agradecimientos personales

A mi **madre** que con su amor y ejemplo ha logrado hacer de mí una mujer diferente.

A mi **padre** que sin importar las adversidades me ha apoyado y protegido a lo largo de mi vida.

A mi **Carnalita**, la **Mayris** y la **Brujis** que han sido un apoyo para realizar mis sueños y me han ayudado a levantarme en los momentos difíciles.

A mi **abuelita Rosa** por su cariño y apoyo incondicional.

A mi **familia**: tías, tíos, primas, primos y agregados. Gracias por apoyarme y aceptarme tal como soy.

A mis **amigos** que siempre me brindan una sonrisa sincera y una chela bien fría. No necesito sentir su mano para saber que caminan a mi lado en todo momento

A mis **compañeros** y **amigos** del laboratorio por hacer el trabajo más llevadero. En especial a **Paty** y a **Eddy** que me han escuchado y apoyado sinceramente.

A la **familia Rajchenberg-Ceceña** por brindarme su apoyo y amistad. Especialmente a **Ana Ester** que además de ser una amiga es un gran ejemplo en mi vida.

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi querida
abuela

Eloísa Rentería Sáyago.

Tu mar siempre vivirá en mi corazón

Nímit'z neki

Lo cierto es que la mayoría de las mujeres son débiles, sean mortales o
inmortales. Pero cuando son fuertes, resultan absolutamente impredecibles.

Anne Rice

Lestat el vampiro, 2004

Índice

Abreviaturas comunes

Resumen

Abstract

Antecedentes

Etnofarmacología

Plantas medicinales

Especies a estudiar

Cecropia obtusifolia Bertol.

Cecropia peltata L.

Tournefortia hirsutissima L.

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus tipo 1

Diabetes mellitus tipo 2

Pre-diabetes

Estadísticas

Tratamientos para la DMT2

Diabetes y producción de glucosa hepática

Regulación hepática de la glucosa

Regulación enzimática de la producción de glucosa hepática

Glucólisis

Diferencias entre la ruta de la glucólisis y la gluconeogénesis

Gluconeogénesis a partir de piruvato

Sistema glucosa-6-fosfatas

Regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis

Modelo n5-STZ

Modelo de piruvato

Ácido clorogénico (CGA)

Objetivos

Hipótesis

Metodología

Química

Elaboración de extractos

Análisis

Prueba de tolerancia a piruvato

Método de inhibición de la glucosa-6-fosfatasa

Aislamiento de microsomas intactos de rata

Ensayo

Resultados

Química

Prueba de tolerancia a piruvato

Inhibición de la glucosa-6-fosfatasa

Discusión

Conclusiones

Referencias

Tabla de contenido

PALABRAS CLAVE

Diabetes mellitus

Plantas hipoglucemiantes

Gluconeogénesis

ABREVIATURAS COMUNES

Acetil-CoA= Acetil Co-enzima A

ADA= American Diabetes Asociation

ADP= Adenocil- difosfato

AMP= Adenocil- monofosfato

Aq= Extracto acuoso

ATP= Adenocil-trifosfato

BuOH= Extracto butanólico

CCGA= Grupo control diabético tratado con ácido clorogénico

CD=Grupo control diabético

CGA= Ácido Clorogénico

CND= Grupo control no diabético

Co= Grupo tratado con *Cecropia obtusifolia*

CO₂= Bióxido de Carbono

Cp= Grupo tratado con *Cecropia peltata*

DMT1=Diabetes mellitus tipo 1

FBP= Fructosa-1,6-bifosfatasa

G6P= Glucosa-6- fosfato

G6Pasa= Glucosa-6-fosfatasa

GTP= Guanocil- trifosfato

IFG= Impaired Fasting Glucose (Alteración de la Glucosa en Ayuno)

IGT= Impaired Glucose Tolerance (Intolerancia a la glucosa)

IMSS= Instituto Mexicano del Seguro Social

MNT2= Diabetes mellitus tipo2

NAD⁺= Nicotina adenina dinucleótido

NO= Óxido nítrico

n-STZ= Modelo de inducción, de diabetes mellitus tipo 2, por estreptozotocina

OMS= Organización Mundial de la Salud

PEP= Fosfoenolpiruvato

PEPCK= Fosfoenolpiruvato carboxinasa

spp= Especies

SS= Secretaría de Salud

STZ= Estreptozotocina

T1= Traslocasa 1

Th= Grupo tratado con *Tournefortia hirsutissima*

WHO= World Health Organization

RESUMEN

El estudio de las plantas medicinales es una fuente importante para encontrar nuevos medicamentos. Una de las enfermedades que es tratada con remedios tradicionales es la diabetes mellitus tipo 2 que, actualmente, es muy común entre la población a nivel mundial y, para la cual, es importante el estudio de nuevos medicamentos.

En el presente trabajo se realizaron pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* para demostrar si los extractos butanólicos (BuOH) y acuosos (Aq) de *Cecropia obtusifolia* Bertol, *Cecropia peltata* L y *Tournefortia hirsutissima* L, plantas reportadas con efecto hipoglucemiante, inhiben la gluconeogénesis hepática.

Nuestros resultados muestran que las tres especies tienen efecto inhibitorio sobre la actividad del sistema enzimático G6Pasa. Las IC₅₀ obtenidas para los seis extractos probados fueron: para el extracto BuOH de *C. obtusifolia* de 125 µg/ml, mientras que para su extracto Aq fue de 218 µg/ml; para el extracto BuOH de *C. peltata* fue de 41 µg/ml, mientras que para su extracto Aq fue de 111 µg/ml; para el extracto BuOH de *T. hirsutissima* fue de 39 µg/ml y para su extracto Aq fue de 69 µg/ml.

En la prueba de tolerancia a piruvato, los extractos BuOH's de las tres especies inhiben de manera significativa la hiperglucemia obtenida en el grupo control diabético sin tratamiento, lo cual nos confirma que las tres plantas inhiben la gluconeogénesis hepática. Estos resultados muestran que el extracto BuOH de *C. peltata* es el que presenta mayor actividad hipoglucemiante en esta prueba.

ABSTRACT

The study of medicinal plants is an important source in the search for new drugs. One of the illnesses that is treated with traditional medicine is type 2 diabetes mellitus which is a very common disorder among the world population these days, thus new drugs development is essential.

In this project *in vivo* as well as *in vitro* tests were developed to show whether the butanolic (BuOH) and water (Aq) extracts from *Cecropia obtusifolia* Bertol, *Cecropia peltata*, L and *Tournefortia hirsutissima* L, which are plants reported to be hypoglycemic, inhibit hepatic gluconeogenesis.

Results show that the three species have an inhibitory effect on the G6Pase enzymatic system activity. IC₅₀ values obtained for the six tested extracts were: *C. obtusifolia* BuOH: 125 µg/ml, *C. obtusifolia* Aq: 218 µg/ml, *C. peltata* BuOH: 41 µg/ml, *C. peltata* Aq: 111 µg/ml, *T. hirsutissima* BuOH: 39 µg/ml and *T. hirsutissima* Aq: 69 µg/ml.

BuOH extracts from the three species inhibit hyperglycemia significantly in a Pyruvate Tolerance Test whereas hyperglycemia is not inhibited in the diabetic control group without treatment. These results confirm that the three species inhibit hepatic gluconeogenesis, being *C. peltata* BuOH extract the one which exerts the highest hypoglycemic activity for this test.

ANTECEDENTES

ETNOFARMACOLOGÍA

El concepto de etnofarmacología surgió en la década de los 1960's dentro del ámbito de los agentes psicoactivos, este término adquirió relevancia en 1967 con el libro "Búsqueda etnofarmacológica de drogas psicoactivas" escrito por Efron en ese año (Holmstedt *et al.* 1983).

En 1983 Holmstedt y Brunh definen a la etnofarmacología como: "La exploración interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados por el hombre" (Holmstedt *et al.* 1983).

Es en el año de 1991 con la definición de Schultes: "La observación, identificación, descripción e investigación experimental de los efectos de las drogas utilizadas en la medicina tradicional" con la que se puntualizan los sujetos de estudio de la etnofarmacología, así como cada uno de los aspectos que debe comprender un estudio completo.

PLANTAS MEDICINALES

En México se cuenta con una gran tradición en este tema, ya que existe todavía un gran número de pueblos que utilizan plantas medicinales para tratar diversas enfermedades y cuentan con un gran número de remedios tradicionales.

Sin embargo, para tener un mejor aprovechamiento de éstas, se requiere hacer investigaciones con las que se pueda asegurar que los compuestos presentes en la planta

son los responsables del efecto y que no son tóxicos en las concentraciones que se recomienda tomarlos.

En países como Alemania e Inglaterra se usan los llamados suplementos alimenticios y fitomedicamentos. Los primeros son medicamentos tradicionales que están elaborados con un estricto control de calidad, el cual puede asegurar que el principio activo está presente y que el producto no es tóxico. Los segundos son el resultado del sometimiento de una planta a procesos de extracción, destilación, fraccionamiento, purificación, concentración y/o fermentación. Todos los anteriores, previos a que el producto salgan a la venta (Gaedeckey *et al.*2003)

Las plantas medicinales son utilizadas para muchos padecimientos como diarreas, cólicos, golpes, infecciones, heridas, gastritis, sinusitis y diabetes. Siendo esta última enfermedad la que interesa para el presente trabajo y para la cual son recomendadas las plantas con efecto hipoglucemiante (Aguilar *et al.* 1996).

Un ejemplo muy importante en este tema es el estudio realizado con *Galega officinalis*, planta que era utilizada en la edad media para tratar la diabetes, aunque aún esta enfermedad no se definía como tal. De esta planta se logró aislar la galegina que es un compuesto precursor de la metformina, el cual, es utilizado actualmente como hipoglucemiante oral (Hadden, 2005).

En México se tienen reportadas 306 especies con efecto hipoglucemiante pertenecientes a 235 géneros y 93 familias; donde las que cuentan con más reportes son: Asteraceae (47 spp), Fabaceae (27 spp), Cactaceae (16 spp), Solanaceae y Euphorbiaceae (10 spp) y Laminaceae (9 spp); pero esta cifra puede variar debido a la falta de documentación de un gran número de especies (Andrade-Cetto *et al.* 2005).

Entre las plantas utilizadas en México, para el tratamiento de la diabetes, se encuentran *Tournefortia hirsutissima* L, *Cecropia obtusifolia* Bertol. y *Cecropia peltata* L, de las cuales se ha comprobado previamente su efecto hipoglucemiante (Andrade-Cetto *et al.* 2007b, Andrade-Cetto *et al.* 2001 y Nicasio *et al.* 2005).

ESPECIES A ESTUDIAR

***Cecropia obtusifolia* Bertol. (Cecropiaceae)**

En México se le conoce comúnmente como: Hormiguillo, Chancarro y Guarumbo (fig. 1). Se recomienda para el tratamiento de la diabetes (agua de tiempo), así como para la presión arterial y problemas renales en general. También hay reportes de su uso para piquetes de alacrán, quemaduras, como analgésico para el asma, reuma, obesidad y nervios (Argueta, 1994). El remedio utilizado tradicionalmente para tratar la diabetes es: elaborar una infusión de las hojas de la planta y tomarla a lo largo del día como agua de tiempo.

Esta especie tiene una amplia distribución en México que va desde Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Tabasco y Chiapas en la vertiente del Golfo, y desde Sinaloa hasta Chiapas en el Pacífico. Es una especie propia de vegetación secundaria de cualquier tipo de selva, excepto en selva baja caducifolia y espinosa (Pennington y Sarukan, 1998).



Fig.1. *Cecropia obtusifolia* Bertol.

Descripción botánica

Árbol monopódico de hasta 20 m de altura, con tronco derecho y hueco, con pequeños contrafuertes o raíces zancudas de sección circular, con capa irregular, estratificada y con pocas ramas horizontales al tronco. La corteza es de color gris claro, las hojas se encuentran dispuestas en espiral y aglomeradas en la punta de las ramas, son simples y peltadas, de color verde oscuro, brillante en el haz y grisáceas en el envés. Especie dioica con flores en espigas axilares sostenidas por una bráctea uniforme caediza, las espigas masculinas son pardo grisáceas de 12-15 o 18-20 cm de largo, espigas femeninas de 4-6 o 13-20 cm de largo. Los frutos son aquenios agregados en las espigas, que contienen una semilla de sabor similar al higo y maduran todo el año (Pennington y Sarukan, 1998).

Antecedentes Fitoquímicos

En estudios fitoquímicos se han detectado esteroides y taninos además de azúcares como: ramnosa, glucosa y xilosa; también se reporta la presencia de saponinas y fenoles. (Trejo, 1983). En 2001 Andrade-Cetto y Wiedenfeld reportaron, para el extracto butanólico, la presencia de dos compuestos: la iso-orientina y el ácido clorogénico.

Antecedentes Farmacológicos

En estudios con ratones CD1, con diabetes inducida por alloxan, se reporta la actividad hipoglucemiante del extracto hexánico de la planta (Trejo, 1983). El efecto hipoglucemiante del extracto acuoso, de las hojas, se comprobó en un estudio hecho con conejos hiperglucémicos (Roman-Ramos *et al.* 1991).

Andrade-Cetto y Wiedenfeld, en 2001, probaron el efecto hipoglucemiante de los extractos butanólico y acuoso de las hojas, a una dosis máxima de 150 y 15 mg/kg de peso respectivamente, administrando estos de forma aguda en ratas con diabetes inducida (n-STZ) y señalan a la iso-orientina y el ácido clorogénico, presentes en el extracto, como posibles principios activos para su efecto hipoglucemiante.

Revilla *et al.* 2007 reporta la actividad hipoglucemiante de *Cecropia obtusifolia* probada en pacientes diabéticos.

***Cecropia peltata* L. (Cecropiaceae)**

En México se le conoce comúnmente como: Guarumbo, yagrumo y palo guarumbo (fig. 2). Se distribuye en los estados de: Quintana Roo, Chiapas y Oaxaca. La infusión de la raíz, las hojas hervidas y el jugo de las hojas de la planta femenina son utilizadas para tratar la diabetes. También se recomienda contra la inflamación, reumas, sarna, mal de orín, enfermedades de los riñones y como cardiotónica (Argueta, 1994).



Fig. 2. *Cecropia peltata* L.

Descripción botánica

Es un árbol de 5-12 m de altura, las hojas son grandes y tienen forma de mano abierta; rasposas por el anverso y por el reverso son muy velludas. Las flores son de color crema y están agrupadas, los frutos son verdes. Originaria de América, planta tropical que habita

en climas cálido y semicálido desde el nivel del mar hasta los 800 msnm. Es una especie asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio (Argueta, 1994).

Sarukan en 1998 reporta que la única diferencia entre *C. peltata* y *C. obtusifolia* es el tamaño notablemente menor de las espigas pistiladas y estaminadas es esta última (de 3-5 cm de largo).

Antecedentes Fitoquímicos

Se estudió la actividad antibiótica contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella B. B. newport*, *S.typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*.

Fue reportada como hipoglucemiante por Andrade-Cetto *et al.* en 2005. El mismo autor reporta la presencia de una concentración muy baja de ácido clorogénico en el extracto butanólico (Andrade-Cetto *et al.* 2007a), mientras que Nicasio en 2005 reportó que esta planta tiene una concentración de 19.84 ± 1.64 / g de ácido clorogénico por gramo de hoja seca (Nicasio, *et al.* 2005).

Antecedentes Farmacológicos

Se realizó un estudio en ratones sanos donde se comparó la actividad hipoglucemiante de los extractos metanólicos de *C. peltata* L. y *C. obtusifolia* Bertol, a una dosis de 1 g/kg de peso, y se atribuye su efecto hipoglucemiante al ácido clorogénico (Nicasio, *et al.* 2005).

Se comprobó el efecto hipoglucemiante de los extractos butanólico y acuoso, de las hojas de esta especie; a una dosis de 60 y 200 mg/kg de peso, respectivamente, los cuales

fueron administrados de forma aguda en ratas con diabetes inducida con el modelo n5-STZ. Los autores compararon sus resultados con los que obtuvieron anteriormente para *C. obtusifolia* y concluyeron que, a pesar de contener los mismos compuestos (ácido clorogénico e iso-orientina), la variación en las concentraciones del ácido clorogénico puede estar ligada a la actividad de ambas especies (Andrade-Cetto et al. 2007a).

***Tournefortia hirsutissima* L (Boraginaceae)**

Se le conoce comúnmente como: Palo gacho o Lágrima de San Pedro (fig. 3); se distribuye desde Florida, EUA, hasta Brasil. Es utilizada para tratar problemas de reumas y diabetes por habitantes del estado de Veracruz, los cuales recomiendan tomar una infusión del tallo de la planta para tratar la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).



Fig.3. *Tournefortia hirsutissima* L.

Descripción botánica

Es una liana maderosa, con tallos cilíndricos pubescentes, hojas simples y pubescentes, de venas pinadas y sin estipulas, inflorescencias compuestas, terminales o axiales; flores bisexuales: blancas o amarillas verdosas, pentalobuladas. La fruta es una baya blanca (Andrade-Cetto et al. 2007b).

Antecedentes Fitoquímicos

No se han realizado estudios sobre los compuestos que dan el efecto hipoglucemiante a esta especie (Alarcón-Aguilar *et al.* 1998), pero Andrade-Cetto *et al.* en 2007b reportó que se encuentran 4 compuestos principales en los extractos, butanólico y acuoso, del tallo de esta planta.

Antecedentes Farmacológicos

Se reportó el efecto hipoglucemiante de esta planta en conejos sanos (Alarcón-Aguilar *et al.* 1998). Se probaron los extractos, butanólico y acuoso, de la especie administrados de forma aguda en ratas con diabetes inducida con el modelo n5-STZ, y se comprobó su efecto hipoglucemiante a una dosis máxima de 80 mg/kg de peso para ambos tipos de extractos (Andrade-Cetto *et al.* 2007b).

Otros

Aunque no se cuenta con más reportes para esta especie es importante resaltar que se han hecho estudios con otra especie, de la misma familia, llamada *Tournefortia harwegiana* para la cual, además de haberse comprobado su efecto hipoglucemiante, se han hecho estudios de su efecto como inhibidor de las α -glucosidasas, pero los autores señalan que otro mecanismo de esta planta puede ser la inhibición de la gluconeogénesis hepática (Ortíz-Andrade *et al.* 2005 y Ortíz-Andrade *et al.* 2006).

DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un desorden crónico caracterizado por una alta concentración de glucosa en la sangre (hiperglucemia), causada por una deficiencia en la producción de insulina, a menudo combinada con resistencia a insulina. La hiperglucemia ocurre por un desequilibrio en la producción de glucosa hepática y una reducción en la síntesis de glucógeno, esto provoca glucosuria, poliuria y polidipsia (Rang *et al.* 2008).

Varias complicaciones se desarrollan, con los años, como consecuencia del desorden metabólico en la diabetes. Estas complicaciones pueden ser a niveles microvascular, neurológico y macrovascular, lo que incluye retinopatías, nefropatías, neuropatías e incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Rang *et al.* 2008).

Existen dos tipos principales de diabetes mellitus:

Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1): En la cual hay una falta de producción de insulina, lo cual es esencial para sobrevivir. Esto se debe a una destrucción completa de las células β lo que provoca ausencia de producción de insulina. Sin embargo, en raras ocasiones una diabetes mucho más leve puede deberse a anomalías genéticas determinadas de la síntesis y secreción de la insulina. En México, la Federación Mexicana de Diabetes reporta que, menos del 10% de diabéticos en el país padecen este tipo de diabetes (FMD, 2008).

Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2): Describe un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por una hiperglucemia crónica con disturbios en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas; resultando en defectos en la secreción y/o acción de la

insulina. La DMT2 es mucho más común y cuenta con alrededor del 90% de todos los casos de diabetes en el mundo (WHO, 1999 y ADA, 2004).

Otros tipos de diabetes se presentan en menos del 5% de todos los casos diagnosticados, entre ellos se encuentra la diabetes gestacional (WHO, 2008).

Pre-diabetes

Usualmente el término pre-diabetes se refiere al estado metabólico intermedio entre una homeostasis normal de la glucosa (100 mg/dl) y la diabetes como tal. Bajo este término se engloban dos padecimientos: uno es la alteración de glucosa en ayuno (IFG, siglas del inglés Impaired Fasting Glucose), la cual se diagnostica cuando una persona presenta niveles de glucosa en un rango entre ≥ 100 mg/dl < 126 mg/dl, después de un ayuno de 8 hrs; el otro la intolerancia a glucosa (IGT siglas del inglés Impaired Glucose Tolerance), la cual se diagnostica cuando una persona, después una prueba de tolerancia a glucosa, que dura 120 min, tiene niveles de glucosa plasmática en un rango entre ≥ 140 < 200 mg/dl (ADA, 2008).

Estadísticas

La diabetes es un problema tanto a nivel mundial, como a nivel nacional. La OMS estimó que en el año 2000 el número de enfermos fue de 171 millones, y estima que para el año 2030 el número de enfermos aumente a 366 millones (Ross *et al.* 2003).

La Secretaría de Salud en México, en 2006, reportó que la diabetes mellitus fue la primer causa de mortalidad general en el país, mientras que el IMSS señaló, en el mismo año,

que más de un millón de los 6.5 millones de personas que padecen esta enfermedad desconocen que la tienen (SS, 2006 y IMSS, 2006).

El panorama es alarmante ya que la enfermedad aumenta con la mala alimentación y la vida sedentaria, además no presenta sintomatología, por lo que mucha gente que la padece solo lo sabe cuando la enfermedad está ya muy avanzada.

Se estima que cada año mueren cerca de 4 millones de personas a causa de la diabetes, generalmente debido a las complicaciones cardiovasculares provocadas por la enfermedad. Además hay una pérdida de la productividad debido a que un gran número de pacientes diabéticos no son capaces de seguir trabajando (WHO, 2008). Estas son algunas razones por las que es indispensable realizar estudios sobre ésta enfermedad, sus complicaciones, las posibles terapias y medicamentos.

Tratamientos para la DMT2

Los tratamientos para esta enfermedad tienen como objetivo mantener los niveles de glucosa en un rango normal (100 mg/dl) tanto como sea posible.

Los pacientes con DMT2 son tratados con hipoglucemiantes orales (Moller, 2001). Entre estos se encuentran: las sulfonilureas, como la glibenclamida, que promueven la secreción de insulina de las células β del páncreas, las biguanidas, como la metformina, que reduce la producción de glucosa hepática, las tiazolidinonas como la pioglitazona, que promueven la acción de la insulina y los inhibidores de las α -glucosidasas, como la acarbosa, que interfieren en la absorción de glucosa intestinal (fig.4).

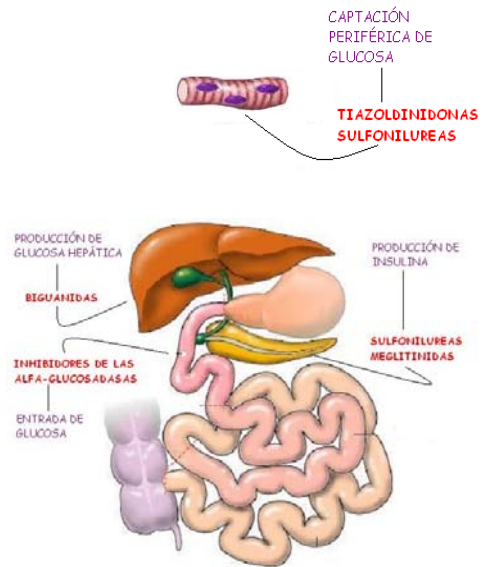


Fig. 4. Hipoglucemiantes orales y su blanco de acción.

(Modificado de iesmonterroso).

Biguanidas

Ciertos tejidos, como el cerebro, dependen fuertemente de la glucosa como fuente de energía. Debido a que la toma de alimentos es intermitente, el hígado provee glucosa para su utilización en tejido periférico entre comidas, manteniendo las concentraciones de glucosa circulante en 100 mg/dl. El hígado genera glucosa por dos vías: libera glucosa a partir de las reservas de glucógeno (glucogenólisis) y genera glucosa de *novo* a partir de pequeños precursores tricarbonados (gluconeogénesis). Las contribuciones relativas de la

glucogenólisis y gluconeogénesis sobre toda la producción hepática varía dependiendo de las condiciones fisiológicas (p. ej. tiempo en ayuno) y están influenciadas por hormonas y disponibilidad de sustrato (Ross, 2004 y Wu *et al.* 2005).

La ingesta de carbohidratos dispara la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. Además, para estimular la producción de la captación de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa. En la DMT2, la habilidad de la insulina para suprimir la producción hepática de glucosa está dañada (insulino resistencia hepática), esto aunado a la sobreproducción hepática de glucosa, contribuyen al estado hiperglucémico en pacientes con esta enfermedad (Wu *et al.* 2005).

Las biguanidas, como la metformina, reducen el nivel de glucosa en la sangre, fundamentalmente, mediante la disminución de la cantidad de glucosa que produce el hígado (ADA, 2008). Compuestos de este tipo pueden actuar inhibiendo el sistema G6Pasa, con esto disminuyen los niveles de glucosa en la sangre y este es una de los mecanismos posibles para controlar la hiperglucemia en pacientes con DMT2 (Kempfer *et al.* 2008).

DIABETES Y PRODUCCIÓN DE GLUCOSA HEPÁTICA

Como ya se mencionó la diabetes está caracterizada, entre otras cosas, por el disturbio en el metabolismo de carbohidratos los cuales provocan una elevación de la glucosa en el plasma. Los mecanismos para la patogénesis de la hiperglucemia aun no están bien definidos pero, sin importar como se desarrolla la hiperglucemia y como esta contribuye a las complicaciones de la diabetes, disminuir los niveles de glucosa en el plasma sanguíneo beneficia a los pacientes diabéticos.

Numerosos estudios señalan que la producción de glucosa hepática juega un papel importante en el desarrollo de la hiperglucemia característica en la diabetes y es por esto que se considera que la disminución en la producción de glucosa hepática es un blanco importante para el tratamiento de la diabetes (Wu *et al.* 2005).

REGULACIÓN HEPÁTICA DE LA GLUCOSA

El nivel de glucosa en el plasma se mantiene en un rango normal durante los periodos de ayuno e ingesta de alimento en organismos sanos. Esta homeostasis es el balance neto entre la absorción de glucosa por el intestino, la producción de glucosa por el hígado y el riñón y las vías de utilización y almacenamiento de ésta por los tejidos del cuerpo. Se ha demostrado que el hígado tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Cuando el organismo está en ayuno, la producción de glucosa por el hígado aumenta, pero durante la ingesta de alimento esta producción se suprime y el hígado utiliza la glucosa para elaborar reservas, esto indica que el control de la producción de glucosa por el hígado sirve como un primer regulador de la homeostasis de la glucosa.

Hay cuatro rutas metabólicas por las que el hígado regula los niveles de glucosa y estos son: glucólisis y glucogénesis las rutas metabólicas en las que la glucosa es utilizada y almacenada, y gluconeogénesis y glucogenólisis las rutas metabólicas de producción de glucosa (Wu *et al.* 2005).

El porcentaje de contribución de la gluconeogénesis y la glucogenólisis en la producción total de glucosa del hígado es controversial, pero se sabe que la glucogenólisis es la ruta mayoritaria de obtención de glucosa durante el ayuno, antes de que el contenido de glucógeno se agote, mientras que la gluconeogénesis es la vía principal cuando las reservas de glucógeno, durante un ayuno prolongado, se han agotado (ídem).

REGULACIÓN ENZIMÁTICA DE LA PRODUCCIÓN DE GLUCOSA HEPÁTICA

La regulación de la producción hepática de glucosa se logra mediante cambios fisiológicos durante los periodos de ayuno e ingesta de alimento, los cuales provocan señales tanto hormonales como nutricionales por parte del sistema nervioso central, el páncreas y el tejido adiposo. Estas señales actúan sobre el hígado y, es este órgano, donde se regula la producción de glucosa por medio de algunas enzimas clave que actúan específicamente en las rutas metabólicas mencionadas anteriormente (Wu *et al.* 2005).

Estas enzimas pueden ser la fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa) y la fosfoenolpiruvato carboxinasa (PEPCK) que son específicas de gluconeogénesis e indirectas de síntesis de glucógeno, opuestas a estas están la 6-fosfofructo-1-cinasa (6PFK1) y la piruvatocinasa (PK), que son enzimas glucolíticas; mientras que para la glucogenólisis está la glucógeno fosfohidrolasa (GP) que es el opuesto de la glucógenosintasa (GS). La glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) cataliza el paso terminal tanto en la gluconeogénesis como

en la glucogenólisis y es opuesta a la glucogenocinasa (GK), que fosforila la glucosa y este es el primer paso para las rutas de utilización y almacenamiento de la glucosa (Wu *et al.* 2005).

Glucólisis

La glucosa que llega al organismo entra a una ruta metabólica llamada glucólisis que es: la fragmentación de la glucosa, molécula que contiene 6 carbonos, en dos moléculas de piruvato (formado por tres carbonos), y tiene lugar en diez pasos (fig. 5); pero de estas reacciones secuenciales de la glucólisis son de especial interés tres tipos de transformaciones químicas (fig. 6):

- La degradación del esqueleto carbonado de la glucosa que da piruvato.
- La fosforilación de ADP a ATP por compuestos fosfato de alta energía, formados durante la glucólisis.
- La transferencia de átomos de hidrógeno o electrones al NAD^+ , formando NADH.

El piruvato puede tomar diferentes rutas metabólicas: en condiciones anaeróbicas hay fermentación en el músculo hasta lactato. En condiciones aeróbicas se oxida con pérdida de su grupo carboxilo en forma de CO_2 , dando origen al grupo acetilo del acetyl-CoA, que entra al ciclo del ácido cítrico; finalmente los electrones de esta oxidación pasan al O_2 a través de la fosforilación oxidativa, formando agua (Lehninger *et al.* 1995).

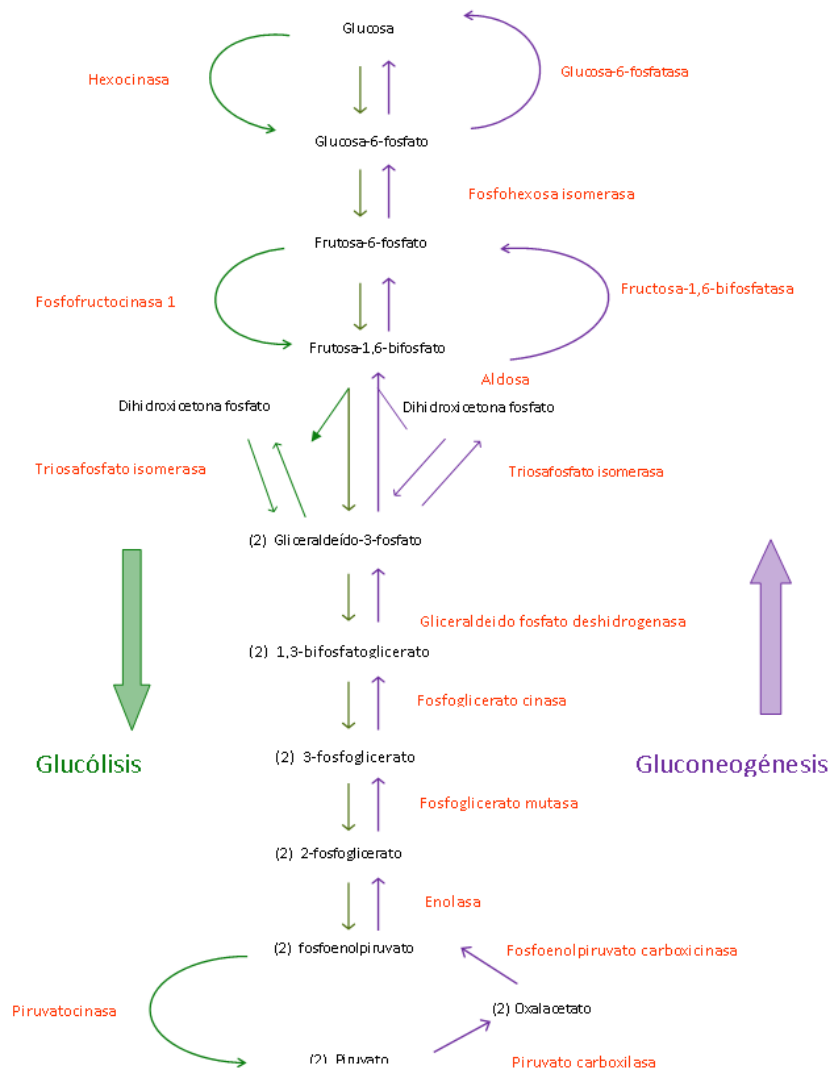


Fig.5. Rutas opuestas gluconeogénesis y glucólisis.

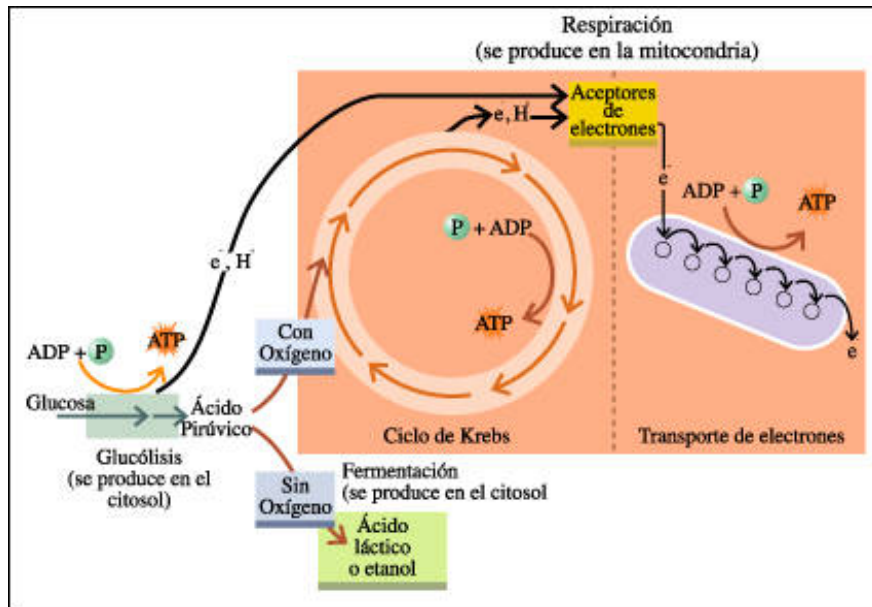


Fig. 6. Ruta de glucólisis.

(Tomado de fisicanet)

Diferencias entre la ruta de glucólisis y gluconeogénesis

La glucólisis, como ya se mencionó, es la ruta por la que se metaboliza la glucosa ingerida en el alimento; pero durante el ayuno se activa otra ruta metabólica que provee al organismo de energía en forma de glucosa y esta ruta se llama gluconeogénesis.

La gluconeogénesis provee glucosa a los tejidos extrahepáticos por medio de su síntesis a partir de pequeños precursores tricarbonados como el glicerol, lactato, piruvato y la mayoría de los aminoácidos. La expresión de enzimas gluconeogénicas clave se da principalmente en el hígado y en grado menor en los riñones.

Sin embargo, aunque esta ruta metabólica comparte muchos pasos con la glucólisis, no todas las reacciones son la inversa de las reacciones glucolíticas (fig. 7). Hay tres pasos de la glucólisis que son prácticamente irreversibles *in vivo* y que no pueden usarse en la gluconeogénesis: la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato por la hexocinasa, la fosforilación de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato por la fosfofructocinasa-1 y la conversión del fosfoenolpiruvato a piruvato por la piruvatocinasa. Estos tres pasos se evitan mediante un conjunto diferente de enzimas que catalizan las reacciones con equilibrios diferentes (reacciones de rodeo); actúan en la gluconeogénesis pero no en la glucólisis y son irreversibles en la dirección de síntesis de glucosa (Wu *et al.* 2005 y Lehninger *et al.* 1995).

Gluconeogénesis a partir de piruvato

Como se mencionó en la sección anterior, la gluconeogénesis es la síntesis de glucosa a partir de pequeños precursores tricarbonados como el piruvato.

En la primera reacción de rodeo el piruvato es transportado desde el citosol a la mitocondria o se genera dentro de la mitocondria por desaminación de la alanina, a continuación, la piruvato descarboxilasa, enzima mitocondrial que requiere biotina, convierte el piruvato en oxalacetato (Lehninger *et al.* 1995).

Este oxalacetato formado en la mitocondria se reduce reversiblemente a malato mediante la malato deshidrogenasa mitocondrial a expensas de NADH. A continuación el malato abandona la mitocondria vía el transportador malato- α -cetoglutarato de la membrana

mitocondrial interna. En el citosol el malato se reoxida a oxalacetato con producción de NADH citosólico¹ (Lehninger *et al.* 1995).

El oxalacetato se convierte en fosfoenolpiruvato (PEP) por la fosfoenolpiruvato carboxilasa en una reacción dependiente de Mg^{2+} en la que el GTP (guanósil- trifosfato) es el dador de fosfato.

En el segundo rodeo la fructosa-1,6-bifosfato pasa a fructosa-6-fosfato, en una reacción catalizada por la fructosa-1,6-bifosfatasa dependiente de Mg^{2+} , esta enzima promueve la hidrólisis prácticamente irreversible del fosfato en el C1.

El tercer rodeo es cuando la glucosa-6-fosfato pasa a glucosa. Esta reacción es catalizada por la glucosa-6-fosfatasa (Wu *et al.* 2005 y Lehninger *et al.* 1995).

¹ Debido a que el NADH citosólico es utilizado en la gluconeogénesis es muy importante la reoxidación del malato a oxalacetato, ya que tiene el efecto de transportar equivalentes de reducción en forma de NADH al citosol, donde la concentración de este es menor que en la mitocondria.

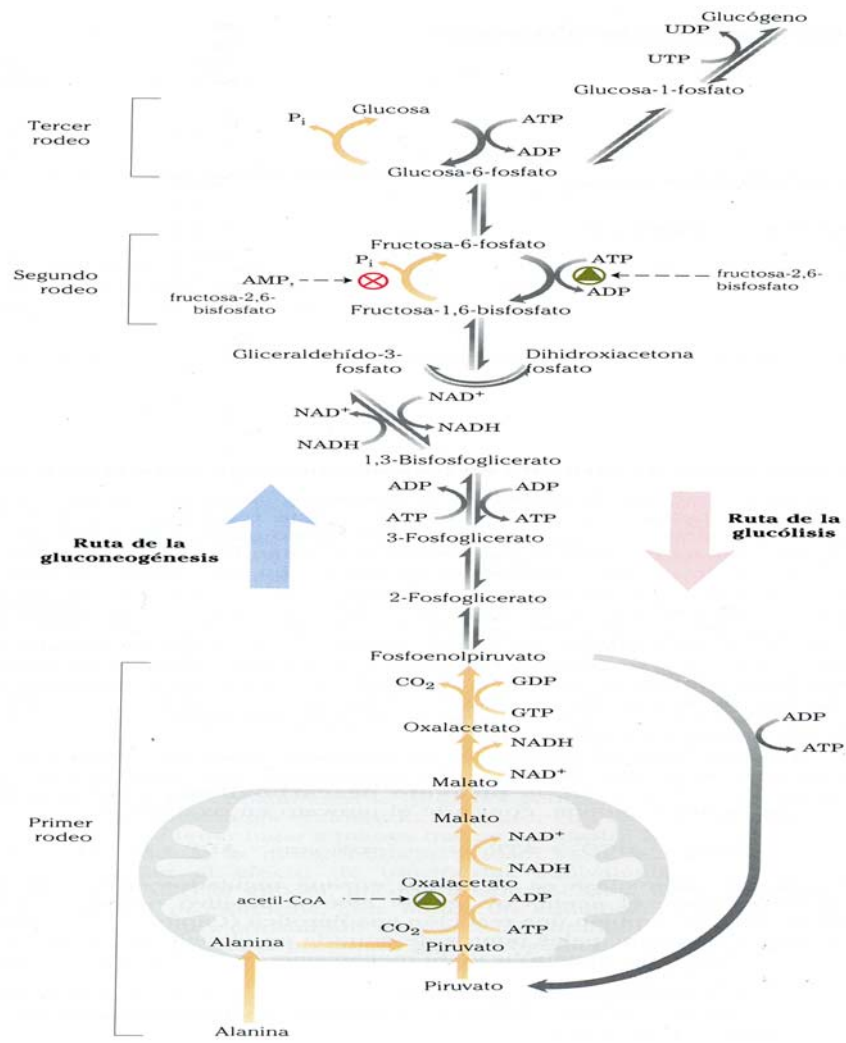


Fig. 7. Reacciones de rodeo de la gluconeogénesis.

(Tomado de Lehninger, 1995)

Sistema Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)

La glucosa-6-fosfatasa cataliza la reacción de desfosforilación de la glucosa-6-fosfato a glucosa. (Arion *et al.* 1997 y Khan *et al.* 1998).

La G6Pasa es un sistema multicomponente presente en el retículo endoplásmico de hígado y en menor medida en riñón (fig. 8). Este sistema que hidroliza la G6P está integrado por cinco proteínas: una traslocasa específica de G6P, denominada T1, que media la entrada de la hexosa fosfatada a través de la membrana hacia el lumen; una fosfohidrolasa específica situada hacia la cavidad del lumen, que corta el fosfato de la glucosa, una proteína estabilizadora denominada SP, una segunda traslocasa (fosfotraslocasa) denominada T2, que media la salida de fósforo inorgánico hacia el citosol y una tercera traslocasa denominada T3, que media el flujo de la glucosa hacia el citosol (Foster *et al.* 2002).

Se ha visto que la actividad de la G6Pasa hepática se incrementa en modelos animales de DMT2 como el de alloxan, estreptozotocina (n-STZ) y ratones ob/ob (Khan *et al.* 1998).

En particular para el modelo n-STZ, se ha visto una sobre expresión de la G6Pasa, un incremento en el ciclo de la glucosa y una disminución en la utilización de la glucosa. También se ha comprobado, por medición indirecta en humanos, que hay un aumento en el ciclo de la glucosa (glucosa → glucosa-6-fosfato → glucosa). Esto sugiere que también, en humanos, un aumento en la actividad de la G6Pasa hepática es una característica temprana del deterioro de la tolerancia a la glucosa (Khan *et al.* 1998).

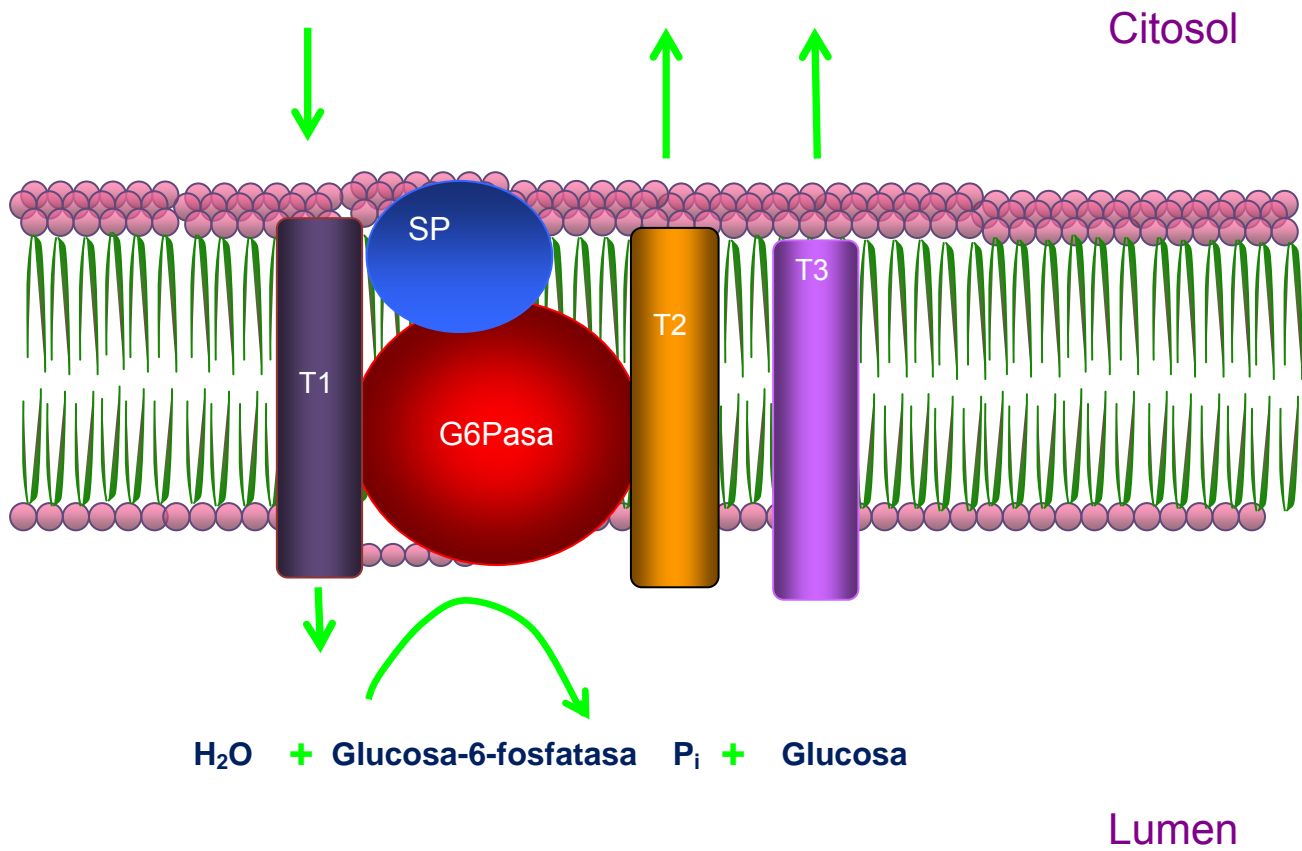


Fig. 8. Sistema G6Pase. T1-traslocasa 1, SP- proteína estabilizadora, G6Pase-glucosa-6-fosfatasa. T2-traslocasa 2 y T3, traslocasa 3.

Regulación de la glucólisis y gluconeogénesis

Para que no exista ciclo fútil² en circunstancias normales, la gluconeogénesis y la glucólisis se regulan por separado y bajo condiciones celulares específicas. El primer punto de control tiene lugar en la reacción catalizada por el complejo de la piruvato deshidrogenasa de la glucólisis y la piruvato carboxilasa de la gluconeogénesis, requiriendo el segundo para su actividad el modulador alostérico acetil-CoA. La consecuencia es que solo hay biosíntesis de la glucosa a partir de piruvato cuando se acumula un exceso de acetil-CoA mitocondrial más allá de las necesidades inmediatas de la célula para el ciclo del ácido cítrico. Cuando están satisfechas las demandas energéticas de la célula, la fosforilación oxidativa se hace más lenta, la acumulación de NADH inhibe el ciclo del ácido cítrico y se acumula acetil-CoA. El incremento de acetil-CoA inhibe el complejo de la piruvato deshidrogenasa, con lo que la formación de acetilCoA, a partir de piruvato, se hace más lenta y se estimula la gluconeogénesis por activación de la piruvato carboxilasa., esto permite que el exceso de piruvato se convierta en glucosa (Lehninger *et al.* 1995).

El segundo punto de control en la gluconeogénesis es la reacción catalizada por la fructosa-1,6-bifosfatasa que es fuertemente inhibida por el AMP cíclico. La correspondiente enzima glucolítica, fosfofructoquinasa-1, es estimulada por AMP y el ADP, pero es inhibido por el citrato y el ATP, por lo que estos dos pasos opuestos, en las dos vías catalíticas, están regulados de forma coordinada y recíproca. Cuando se encuentra presente suficiente concentración de acetil-CoA o del producto de la condensación del acetil-CoA con el oxalacetato (citrato) o cuando se favorece una

² Un ciclo fútil es aquel en el que dos reacciones inversas pueden tener lugar simultáneamente a alta velocidad en la misma célula disipando una gran cantidad de energía en forma de calor.

elevada proporción del adenilato celular en forma de ATP, la gluconeogénesis está favorecida promoviendo de este modo la formación de glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno (Lehninger *et al.* 1995).

La insulina afecta directamente la gluconeogénesis en el hígado inhibiendo la transcripción y consecuentemente la producción de enzimas gluconeogénicas claves llamadas fosfoenolpiruvato carboxinasas (PEPCK), la enzima limitadora de la reacción de gluconeogénesis, fructosa-1,6-bifosfatas y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), de esta manera impidiendo la producción hepática de glucosa. Simultáneamente la insulina estimula la transcripción de enzimas glucolíticas como la glucocinasa y la piruvatocinasa, de esta manera asegurando la oxidación de la glucosa (Ross *et al.* 2004).

En pacientes con DMT2 está dañada la habilidad de la insulina, de disparar la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno, así como la de inhibir simultáneamente la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Wu *et al.* 2005).

MODELO n5-STZ

Para la inducción de diabetes con este modelo se debe inyectar a las ratas estreptozotocina, a una dosis de 90 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, cinco días después de su nacimiento.

El método para inducir diabetes en ratas por medio de una inyección de estreptozotocina (STZ) fue descrito por primera vez por Portha *et al.* en 1974.

La estreptozotocina o 2-deoxymethyl-nitrosoureglycopyranose, es un compuesto aislado del hongo *Streptomyces griseus* (Islas-Andrade *et al.* 2000), el cual provoca la muerte de las células β del páncreas. Este daño sobre las células β pancreáticas está acompañado por una alteración característica en la concentración de insulina y glucosa en la sangre.

Se ha visto que 2 horas después de la inyección es cuando se presenta la hiperglucemia y la baja en la concentración de insulina, 6 horas después la hiperglucemia se mantiene, pero se presenta una alta concentración de insulina en la sangre. Estos cambios en las concentraciones de glucosa e insulina reflejan una alteración en la función de las células β (West *et al.* 1996).

Después de un periodo de entre 8 y 10 semanas las ratas tratadas con STZ presentan una hiperglucemia media basal, un desequilibrio frente a una prueba de tolerancia a glucosa (Portha *et al.* 1979) y una baja de sensibilidad a glucosa por parte de las células β pancreáticas (Giroix *et.al.* 1983).

Las ratas con este modelo de inducción de diabetes, a los 2 meses y medio de edad, presentan características tales como: hiperglucemia basal franca con intolerancia a la glucosa, aumento en la hemoglobina glucosilada, bajas en la reserva de insulina

pancreática, decrecimiento en los niveles de insulina y una carencia de respuesta a la insulina (Portha *et al.* 2001).

La acción intracelular de la STZ provoca la muerte de las células β pancreáticas por fragmentación de su DNA. Recientes experimentos han probado que la forma principal por la que la STZ induce la muerte de las células β es por alquilación del DNA (Delaney *et al.* 1995, Elsner *et al.* 2000). La actividad de la alquilación de la STZ está relacionada con un estado permanente de transición de su nitrosurea la cual metila las purinas, en particular las guaninas.

La STZ es considerada como un donador de óxido nítrico (NO), este compuesto provoca la destrucción de los islotes de células pancreáticas, por lo cual se propuso que el NO es una molécula que contribuye al daño en el DNA provocado por la STZ (Turk *et al.* 1993 y Krôncke *et al.* 1995) Sin embargo la STZ no es un donador espontáneo de NO (Krôncke *et al.* 1995), pero este compuesto es liberado cuando la STZ se metabolizada dentro de la célula y las altas concentraciones del NO contribuyen al daño en el DNA, pero esta no es la única molécula reactiva que provoca la citotoxicidad de la STZ (Bedoya *et al.* 1996). Se ha visto que la STZ también genera especies reactivas de oxígeno, las cuales contribuyen igualmente a la fragmentación del DNA y provocan otros cambios deletereos en las células (Takasu *et al.* 1991b y Bedoya *et al.* 1996). La formación de aniones superóxido resulta tanto de la acción de la STZ sobre la mitocondria, como del incremento de la actividad de la xantinaoxidasa.

Se demostró que la STZ inhibe el ciclo de Krebs (Turk *et al.* 1993) y baja sustancialmente el consumo de oxígeno de la mitocondria (Nukatsuka *et al.* 1990b). Este efecto limita fuertemente la producción de ATP de la mitocondria y hay un aumento en la

desfosforilación del ATP, lo cual incrementa el suministro del sustrato de la xantina oxidasa y con esto se aumenta la producción de ácido úrico -producto final de la degradación de ATP-(Nukatsuka *et al.* 1998). Es en esta reacción de catálisis de la xantina oxidasa en la que se forman los aniones superóxido como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo libres (Nukatsuka *et al.* 1990a y Takasu *et al.*, 1991b).

La potente alquilación provocada por la STZ podría ser considerada la causa mayoritaria que provoca su citotoxicidad en las células β pancreáticas; sin embargo el óxido nítrico y las especies reactivas del oxígeno, de manera sinérgica, podrían contribuir a la fragmentación del DNA y los cambios deletéreos causados por la estreptozotocina; pero estas mismas moléculas podrían actuar formando peroxinitrato, una molécula que es altamente reactiva (fig.9) (Szkudelski, 2001).

El daño del DNA inducido por la STZ activa la poliribosilación del ADP (Sandler *et al.* 1983), este proceso provoca el agotamiento del NAD^+ celular, además provoca una disminución en el contenido de ATP (Heller *et al.*, 1994) y subsecuentemente hay una inhibición de la síntesis y secreción de insulina (Nukatsuka *et al.* 1990b).

En conjunto estas son las razones por las que la STZ provoca el estado diabético de las ratas tratadas.

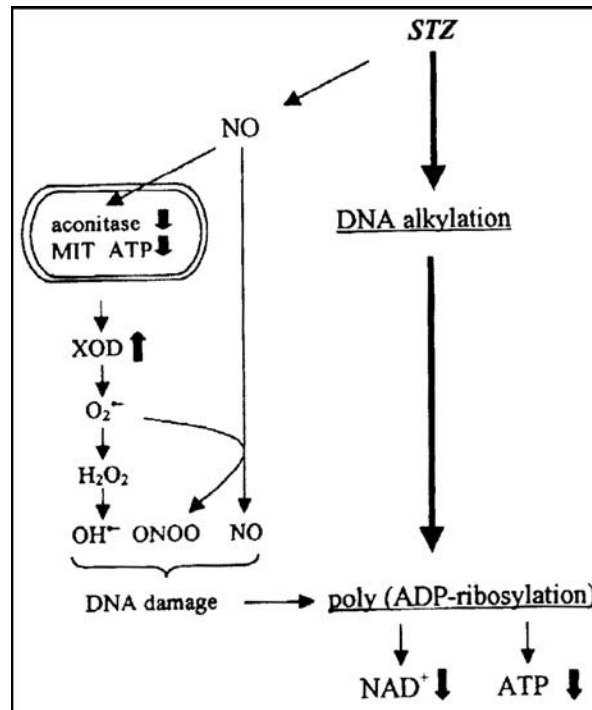


Fig. 9. Mecanismos por los que la STZ provoca citotoxicidad en células β pancreáticas de rata (MIT- mitocondria, XOD- xantinoxidasa (Tomado de Szkudelski, 2001).

MODELO DE PIRUVATO

Para este modelo se utilizan ratas Wistar diabéticas (n5-STZ) en las cuales se promueve la gluconeogénesis hepática por medio de un ayuno prolongado y una inyección intraperitoneal de piruvato a una dosis de 2 g/kg de peso (Miyake *et al.* 2002).

En un organismo normal las reservas energéticas pueden ser de tres tipos: glucógeno almacenado en el hígado y músculo en cantidades pequeñas, unas cantidades mucho

mayores de triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo y proteínas tisulares, que pueden degradarse cuando sea necesario para proveer combustible (Lehninger *et al.* 1995).

Tras un ayuno de toda la noche, casi todo el glucógeno hepático y la mayor parte del glucógeno muscular se han gastado, a las 24 horas, la glucosa de la sangre empieza a disminuir, la secreción de insulina se frena y se estimula la secreción de glucagón. Estas señales hormonales provocan la movilización de triacilgliceroles, que se convierten en el principal combustible para el músculo y el hígado. Para proporcionar glucosa al cerebro, el hígado degrada ciertas proteínas, aquellas menos imprescindibles para un organismo que no ingiere alimento, sus grupos amina se convierten en urea, esta se transporta a través de la circulación sanguínea hasta el riñón, donde se excreta, también los esqueletos carbonados de los aminoácidos gluconeogénicos se convierten en piruvato o en intermedios del ciclo del ácido cítrico, estos intermediarios, así como el glicerol derivado de los triacilgliceroles en el tejido adiposo, proporcionan la materia prima para la gluconeogénesis, garantizando la disponibilidad de glucosa para el cerebro (Lehninger *et al.* 1995).

Finalmente, la utilización en la gluconeogénesis de intermediarios del ciclo del ácido, provoca el agotamiento de oxalacetato imposibilitando la entrada de acetil-CoA en el ciclo. El acetil-CoA, producido por la oxidación de ácidos grasos, se acumula, favoreciendo la formación de cuerpos cetónicos en el hígado (acetoacetato, D-β-hidroxiacetato y acetona). Tras pocos días de ayuno, los cuerpos cetónicos en la sangre aumentan, puesto que el hígado exporta estos combustibles al corazón, al músculo esquelético y al cerebro para su utilización en lugar de glucosa.

Un ayuno excesivo podría ser muy peligroso, ya que conduciría a la sobreproducción de cuerpos cetónicos y posiblemente a la muerte. Cuando en un organismo las reservas de grasa se han agotado, empieza la degradación de proteínas esenciales, con pérdida de función cardíaca y hepática, lo cual provoca la muerte (Rang *et al.* 2008).

Con un ayuno prolongado, de aproximadamente 16 horas, los animales tienen como principal ruta de producción de energía la gluconeogénesis (sin estar en peligro de presentar sobreproducción de cuerpos cetónicos) (Wu *et al.* 2005); además una característica de los animales diabéticos es la hiperglucemia, la cual está asociada a un incremento en la producción de glucosa hepática ambas condiciones aunadas a la administración de piruvato, un sustrato de la gluconeogénesis que provoca un incremento exagerado (1.5 veces) de la concentración de glucosa en la sangre, aseguran que para estos animales la ruta de la gluconeogénesis hepática está promovida (Miyake *et al.* 2002).

Existen compuestos como la metformina, el ácido-3-mercaptopicolínico y el ácido clorogénico que inhiben la gluconeogénesis hepática y este efecto ayuda al tratamiento en pacientes diabéticos tipo 2. Actualmente la metformina es el único medicamento, del tipo biguanida, recetado por los médicos (Hemmerle *et al.* 1997 y Khan *et al.* 1998).

ÁCIDO CLOROGÉNICO (CGA)

En 1920 se identificó por primera vez la molécula de ácido clorogénico (ácido 5-caffeoylquinic fig. 10, Cori, 1952), la cual juega un papel importante en el metabolismo de las plantas, además de presentar un efecto antioxidante (Hemmeler *et al.* 1997).

La presencia de este compuesto ha sido reportada en hojas de *C. obtusifolia* y *C. peltata* y estas plantas son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes, además el efecto hipoglucemiante de algunos de sus extractos ha sido comprobado en modelos animales de DMT2 (Trejo, 1983; Andrade-Cetto *et al.* 2001; Revilla *et al.* 2007; Nicasio *et al.* 2005; Andrade-Cetto *et al.* 2007a; Alarcón-Aguilar *et al.* 1998 y Andrade-Cetto *et al.* 2007b).

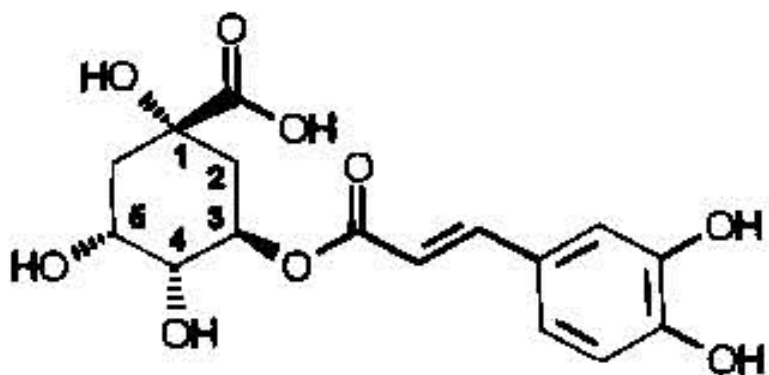


Fig.10. Fórmula estructural del ácido clorogénico.

(Tomada de Hemmeler *et al.* 1997).

Se ha demostrado que este compuesto y algunos de sus derivados sintéticos inhiben el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa, que como ya hemos visto, cataliza el paso final de la gluconeogénesis hepática (Arion *et al.* 1997 y Simon *et al.* 2000, tomado de Kempfer, 2008).

Fue en 1997 cuando Hemmeler y colaboradores identificaron al CGA como un inhibidor específico de la traslocasa 1 del sistema G6Pasa, propuesto en los años 1990's (Arion *et al.* 1997 y Khan, 1998).

También se ha demostrado que el CGA y sus derivados sintéticos disminuyen la producción de glucosa hepática y bajan los niveles de glucosa en la sangre, con lo cual estos compuestos ofrecen una importante posibilidad para regular la sobreproducción de glucosa en el hígado y así controlar la hiperglucemia en pacientes diabéticos tipo 2 (Arion *et al.* 1997 y Khan, 1998).

OBJETIVOS

GENERAL

- Probar el efecto inhibitorio de los extractos de *Tournefortia hirsutissima* L, *Cecropia obtusifolia* Bertol y *Cecropia peltata* L sobre la gluconeogénesis hepática.

PARTICULARES

- Analizar el contenido de iso-orientina y ácido clorogénico en los extractos utilizados de las tres plantas en estudio.
- Probar el efecto inhibitorio de la liberación de glucosa hepática de los extractos butanólicos de *T. hirsutissima*, *C. obtusifolia* y *C. peltata* a través de una prueba de tolerancia a piruvato.
- Probar el extracto butanólico y acuoso de *Tournefortia hirsutissima* L, *Cecropia obtusifolia* Bertol y *Cecropia peltata* L. sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en microsomas hepáticos intactos de rata (Wistar).

HIPÓTESIS

Tournefortia hirsutissima, *Cecropia obtusifolia* y *Cecropia peltata* inhibirán la actividad del sistema G6Pasa *in vitro*, las dos últimas debido a su contenido de ácido clorogénico. Estas plantas regularan los niveles de glucosa alcanzados en la prueba de tolerancia a piruvato en las ratas n5-STZ, indicando una inhibición de la gluconeogénesis hepática *in vivo*.

METODOLOGÍA

QUÍMICA

Elaboración de extractos

En este estudio se utilizaron dos formas de extracción para las tres especies en estudio, una fue la infusión de la planta (llamada extracto acuoso) y la otra fue una extracción butanólica realizada en soxhlet.

Infusión (extracto acuoso Aq)

Se utilizó agua como solvente y de 10 a 15 g de planta seca y molida.

Se colocó el material vegetal en el agua y se calentó hasta ebullición, en este punto se dejó durante 5 min (con agitación permanente). Se dejó enfriar y se filtró con tierra de diatomeas, la mezcla obtenida se congeló y posteriormente se liofilizó.

Extracción en soxhlet (extracto butanólico BuOH)

Se colocaron de 25-30 g de material vegetal en un cartucho dentro del soxhlet (fig. 11), se extrajo por un periodo de 2 días con hexano. Trascurrido este tiempo se dejó secar el cartucho por un día y se extrajo nuevamente con metanol (MeOH) durante 2 días.

Se evaporó completamente el MeOH, se realizó una limpieza de clorofilas (Agua: MeOH: CCl₄ 10:40:50) y se hizo una partición v: v (1:1) Agua: Butanol. La fase butanólica se evaporó totalmente para el estudio.

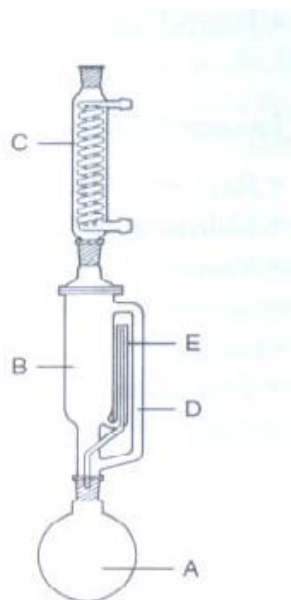


Fig. 11. Soxhlet (Tomada de Kuklinski, 2000)

Análisis

Los extractos de las tres especies fueron analizados por HPLC. Los extractos de ambas especies de *Cecropia* fueron analizados para comprobar la presencia de ácido clorogénico e iso-orientina reportados por Andrade-Cetto *et al.* 2001, mientras que para los extractos de *Tournefortia hirsutissima* además de buscar la presencia de los compuestos presentes en las especies de *Cecropia*, se comprobó si los compuestos mayoritarios reportados por Andrade-Cetto *et al.* 2007 estaban presentes en los extractos.

PRUEBA DE TOLERANCIA A PIRUVATO

Para esta prueba se utilizaron ratas Wistar diabéticas (n5-STZ), las cuales se obtuvieron inyectando en la vena caudal STZ, a una dosis de 90 mg/kg de peso, después de cinco días de nacidas. Se utilizaron solamente las ratas que a los dos meses y medio o tres de edad presentaron niveles de glucosa plasmática mayores a 145 mg/dl en ayuno y que tuvieran un peso aproximado de 250 g.

A estos animales se les dejó en ayuno de aproximadamente 16 hrs, este ayuno prolongado agotó la glucosa obtenida por la ingesta de alimento y las reservas de glucógeno, promoviendo así la gluconeogénesis como ruta metabólica para la obtención de energía.

Se formaron grupos de 11 ratas, se probó la técnica con un grupo de ratas no diabéticas y uno de ratas diabéticas (<145 mg/dl). Los grupos experimentales se muestran en la Tabla 1.

A todos los grupos se les inyectó piruvato de forma intraperitoneal, a una dosis de 2 g/kg de peso, en solución salina (Miyake *et al.* 2002). Esto con el fin de promover la gluconeogénesis a partir de un exceso de piruvato. Se midieron los niveles de glucosa tomando una muestra de sangre de la vena caudal, a los 0, 30, 60, 90 y 120 min. La medición se realizó con el glucómetro Accutrend.

Para el grupo control se utilizó como control el ácido clorogénico que se ha reportado como inhibidor de la T1, con lo cual se inhibe la actividad del sistema G6Pasa (Arion *et al.* 1997; Hemmerle *et al.* 1997; Khan *et al.* 1998). La dosis utilizada fue de 5 mg/kg de peso y se administró de forma oral (Delcy *et al.* 2002).

A todos los animales se les midió el nivel de glucosa al tiempo 0; 15 minutos después se les administró el ácido clorogénico o el extracto a probar y 5 min después se les inyectó el piruvato.

Tabla. 1. Grupos experimentales para la prueba de tolerancia a piruvato.

Grupo	Ratas Wistar, con diabetes moderada (<145mg/dl)	Tratamiento y concentración
1	11	Solución salina
2	11	Solución salina
3	11	Ácido clorogénico 5mg/Kg
4	11	BuOH de <i>T. hirsutissima</i> 80mg/Kg
5	11	BuOH de <i>C. obtusifolia</i> 150mg/Kg
6	11	BuOH de <i>C. peltata</i> 150mg/Kg

MÉTODO DE INHIBICIÓN DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA

Aislamiento de microsomas intactos de rata.

Para la obtención de microsomas se utilizaron ratas Wistar macho de aproximadamente 3 meses de edad, con un peso entre 250-300 g. Se dejaron en ayuno por 8 hrs, posteriormente se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital a una dosis de 5 mg/100 g de peso. Se abrió el abdomen y se inyectó 0.1 ml de heparina (10 u/ml). Se perfundió el hígado a través de la vena porta con 20 ml de solución salina fría (4-5°C). Se disectó el hígado, se pesó y cortó en trozos muy pequeños.

Se homogenizaron 3 g de hígado de rata con 5 ml de buffer de homogenización (0.25 M de sacarosa 1 mM EDTA, 5mM Hepes, con un pH de 7.4) dando de 7-10 pases en un homogenizador Dounce con el pistilo holgado.

Se diluyó a una concentración de 1:10 con buffer de homogenizado y se filtró con tela de nylon. Se centrifugó a 1000 g/10 min y se separó el sobrenadante. Este se centrifugó a 12,000 g/10 min en el rotor 50Ti de Beckman. El sobrenadante se dividió en 4 tubos y se centrifugó a 100,000 g/1 hr en el rotor 50Ti. Las pastillas se conservaron a -20°C y se utilizaron en un periodo máximo de una semana (Pullman, 1967).

Así se obtuvieron los microsomas intactos, de manera que estos microsomas mantienen la actividad de los tres componentes del sistema G6Pasa (Arion *et al.* 1997).

Ensayo

Se calculó la actividad enzimática de forma indirecta en estos microsomas midiendo la formación de fósforo inorgánico desde glucosa-6-fosfato (Arion, 1989). Los extractos

BuOH y acuoso de *T. hirsutissima*, *C. obtusifolia* y *C. peltata* se agregaron al medio a concentraciones de: 2, 5, 20, 50, 200, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g/ml}$, el ensayo se realizó por triplicado para cada uno de los extractos probados, incluyendo el ácido clorogénico como control positivo, y se realizó un blanco como control negativo.

Se agregaron a cada tubo:

50 μl de buffer de himidazol (40 mM, pH 6.8, 0.5 M sacarosa).

5-10 μl de extracto.

5 μl de microsomas (una pastilla resuspendida en 0.5 ml de buffer de homogenización).

10 μl de G6P (20 mM).

Agua en cantidad suficiente para completar 100 μl .

Se incubó a temperatura ambiente por 20 min, transcurrido este tiempo se agregaron 0.9 ml de solución de trabajo para fosfatos y se incubó por 20 min a 45°C.

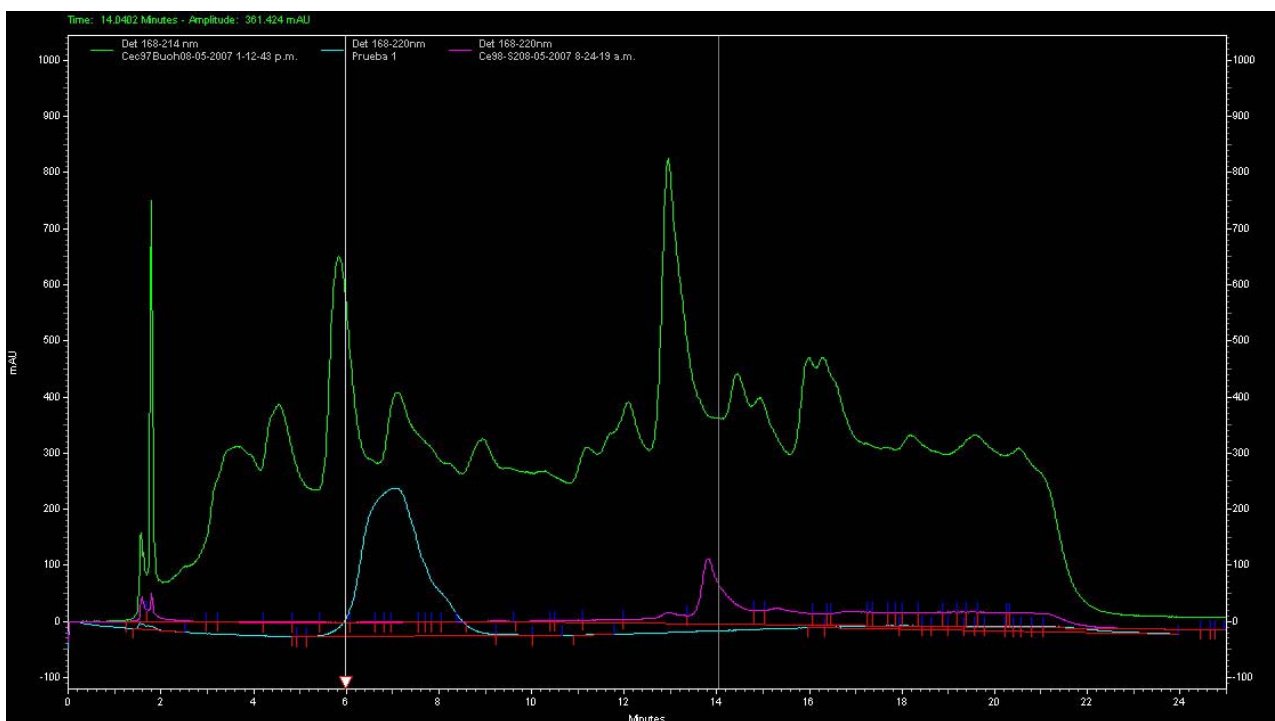
Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 830 nm.

Se calcularon las IC_{50} por método gráfico de las curvas dosis-respuesta.

RESULTADOS

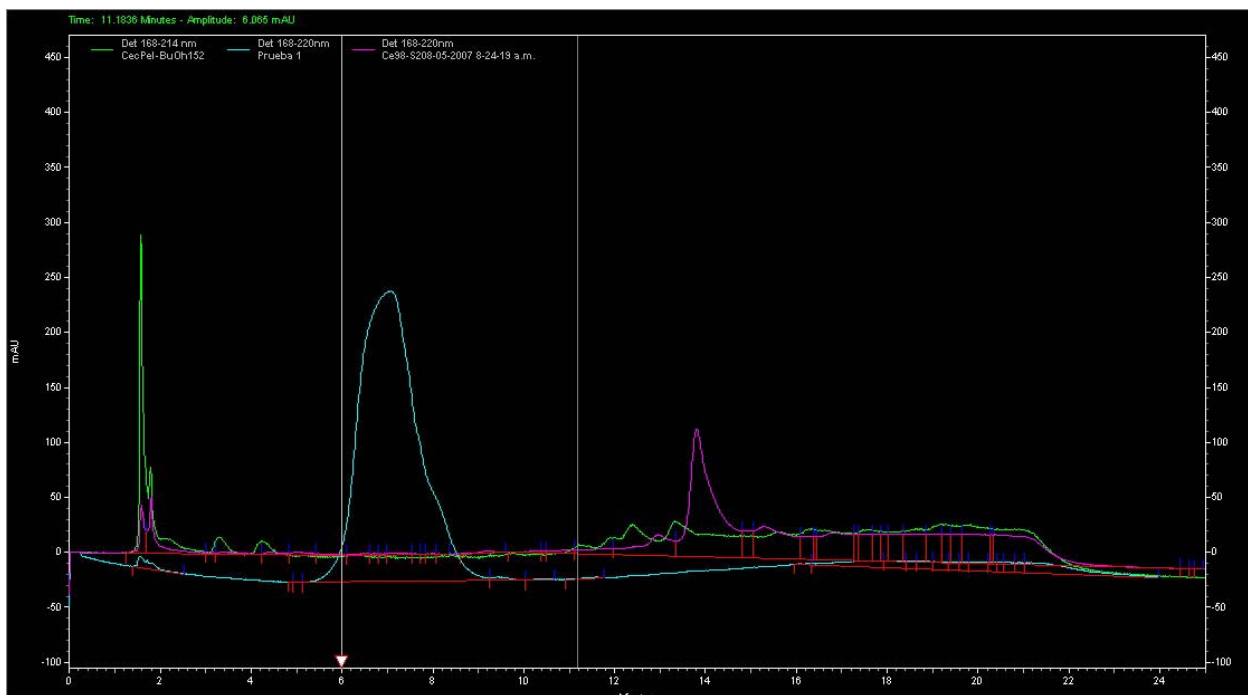
QUÍMICA

En el cromatograma 1 se comprueba que para el extracto BuOH utilizado de *Cecropia obtusifolia* están presentes tanto el ácido clorogénico como la iso-orientina.



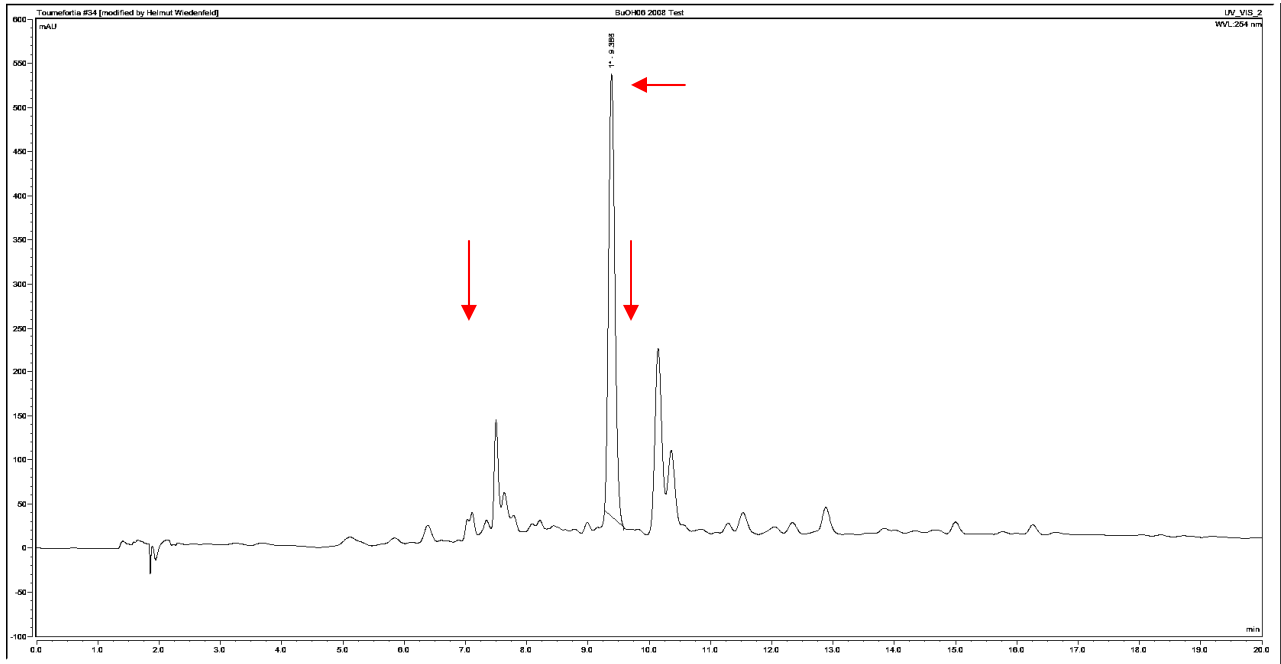
Crom. 1. La línea verde representa el extracto BuOH utilizado de *C. obtusifolia*, en azul el ácido clorogénico puro y en morado la iso-orientina pura.

El cromatograma 2 muestra el extracto BuOH utilizado de *C. peltata* y se comprueba la presencia de iso-orientina, pero no se aprecia claramente si el ácido clorogénico no está presente o si se tiene en una concentración muy baja.



Crom.2. La línea verde representa el extracto BuOH utilizado de *C. peltata*, en azul el ácido clorogénico puro y en morado la iso-orientina pura.

El cromatograma 3 muestra el extracto utilizado de *T. hirsutissima*, en el que se aprecian únicamente tres compuestos mayoritarios, pero estos no corresponden ni al ácido clorogénico ni a la iso-orientina (datos no mostrados) y a diferencia de lo reportado por Andrade-Cetto et al. en 2007 solo encontramos tres compuestos mayoritarios.



Crom.3. Las flechas rojas en el comatograma muestra tres los tres compuestos mayoritarios detectados en el extracto BuOH de *T. hirsutissima*.

PRUEBA DE TOLERANCIA A PIRUVATO

Como se esperaba, para el control no diabético (CND, barra amarilla graf. 1) hubo un incremento en los niveles de glucosa a los 30min que disminuyó en los siguientes tiempos, de modo que al término del experimento la glucosa se encontraba en los niveles basales, mientras que para el control diabético sin tratamiento (CD, barra roja graf. 1) se observó un aumento desde los 30min pero éste es mucho más drástico que el del CND y

se mantuvo a lo largo del experimento de manera que, a los 120 min, se tienen niveles de casi el doble de los basales.

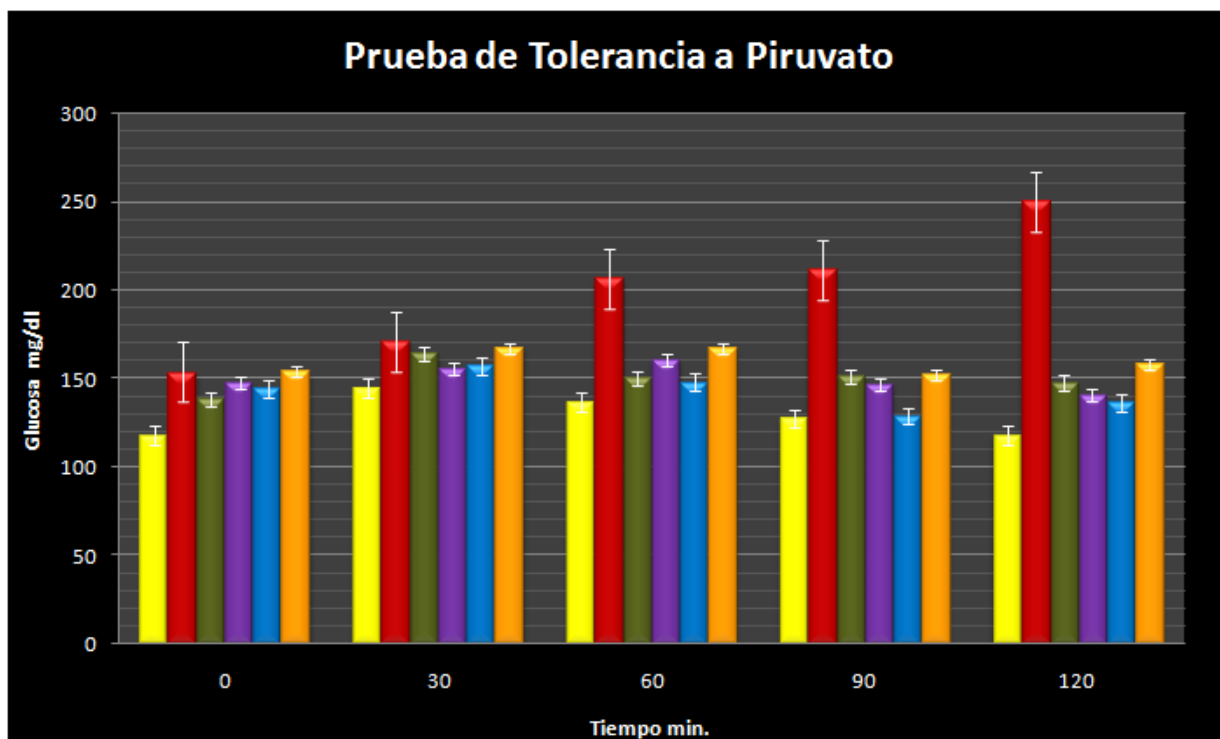
Para el grupo control tratado con ácido clorogénico (CCGA, barra verde graf. 1) se ve, al igual que para los grupos CND y CD, un aumento de los niveles de glucosa a los 30min, pero éste es menor que para el grupo CD y mayor que para el grupo CND pero, como se esperaba, estos niveles comienzan a disminuir desde los 60 min de manera que, al término del experimento, los valores bajaron significativamente pero no alcanzaron los niveles basales.

Para el extracto de *T. hirsutisiima* (Th, barra naranjada graf. 1) también se tiene un aumento a los 30 min que es significativamente menor al del CD, pero a diferencia del grupo tratado con ácido clorogénico los niveles se mantienen altos a los 60 min y comienzan a disminuir hasta los 90 min, con este extracto los valores finales de glucosa quedan ligeramente elevados con respecto a los basales.

Para el extracto de *C. obtusifolia* (Co, barra morada graf. 1) se ve un aumento moderado de los niveles de glucosa con respecto a los basales a partir de los 30 min, pero este es significativamente menor al presentado por el grupo CD, sin embargo a los 60 min continúa un ligero aumento en los niveles de glucosa a diferencia del grupo CCGA, es hasta los 90 min que se ve una disminución del valor de la glucosa plasmática y esta continúa de manera que, al fin del experimento, los niveles de glucosa se encuentran en los basales.

Para el extracto de *C. peltata* (Cp, barra azul graf. 1) se ve el aumento de los niveles de glucosa con respecto a los basales a los 30 min, pero estos niveles disminuyen a partir de los 60 min alcanzando los basales, pero los valores de glucosa continúan disminuyendo

de forma considerable de manera que, a los 90 min, los valores están significativamente debajo de los iniciales y, aunque se ve un ligero aumento de los valores de glucosa, estos se mantienen por debajo de los basales a los 120 min.

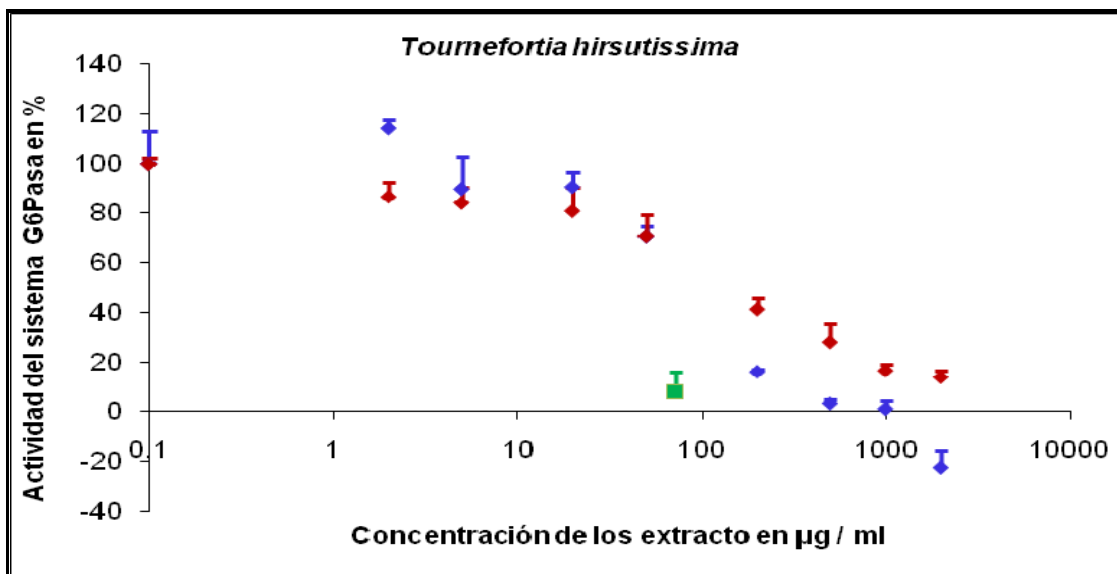


Graf. 1 Se muestran los resultados obtenidos en la prueba de tolerancia a piruvato. Las barras son las medias más la desviación estándar de los niveles de glucosa plasmática obtenidos durante el experimento (n por grupo=11). En amarillo se muestra el grupo no diabético (CD), en rojo el grupo diabético sin tratamiento (CD), en verde el grupo tratado con ácido clorogénico (CCGA) a una dosis de 5 mg/kg de peso, en morado el grupo tratado con el extracto BuOH de *Cecropia obtusifolia* (Co) a una dosis de 150 mg/kg de peso, en azul el grupo tratado con el extracto BuOH de *Cecropia peltata* (Cp) a una dosis de 150 mg/kg de peso y en anaranjado el grupo tratado con el extracto BuOH de *Tournefortia hirsutissima* (Th) a una dosis de 80 mg/kg de peso.

INHIBICIÓN DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA

Tournefortia hirsutissima

Se realizó una regresión lineal de los datos obtenidos, los valores para el extracto BuOH fueron: IC₅₀ de 39 µg/ ml, pendiente de -0.30, ordenada al origen de 1.03 y su coeficiente de correlación de -0.97; mientras que los valores obtenidos para el extracto Aq fueron: IC₅₀ de 63 µg/ml, pendiente de -0.99, ordenada al origen de 2.53 y su coeficiente de correlación de -0.98.



Graf. 2 Aquí se muestra el porcentaje de actividad del sistema G6Pasa a diferentes concentraciones de los extractos probados de *T. hirsutissima*, en rojo se muestra el BuOH, en azul el Aq y en verde el CGA, todos los datos muestran la media más su desviación estándar. El valor obtenido para la I_{c50} fue de 39 µg/ml para el extracto BuOH, de 63 µg/ml para el extracto acuoso y de 246 µg/ml para el CGA.

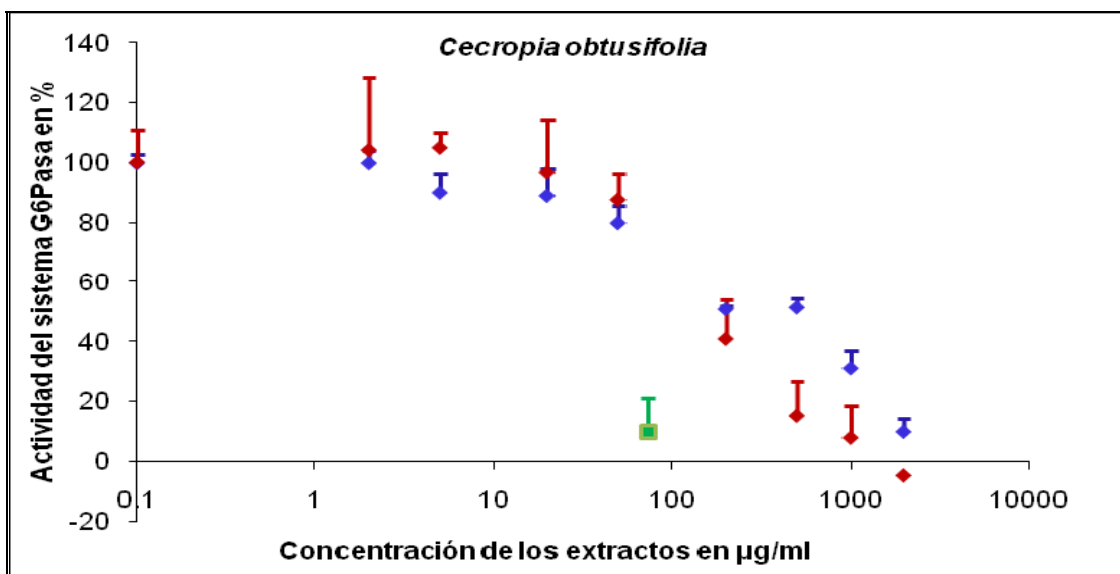
En la grafica 2 se muestran los resultados obtenidos para ambos extractos, en ella podemos ver que el efecto inhibitorio del extracto butanólico (en rojo) sobre la G6Pasa comienza a la concentración mínima probada de 2 µg/ml, pero es hasta la concentración de 20 µg/ml cuando se observa un aumento en el porcentaje de inhibición, esta actividad aumenta de forma lineal hasta los 1000 µg/ml donde el porcentaje de inhibición se mantiene. Para el extracto acuoso (en azul) la actividad comienza a los 50 µg/ml y la inhibición aumenta de forma mucho más drástica, de manera que a 500 µg/ml la inhibición es prácticamente total y se mantiene a las concentraciones máximas probadas, incluso a los 2000 µg/ml se observa un valor menor al cero.

Cabe resaltar que a pesar de que el extracto BuOH tiene una IC₅₀ menor que la del extracto Aq, el porcentaje de inhibición aumenta de manera más paulatina que para el extracto acuoso, además esta actividad no llega a ser del 100%, llega a su máxima actividad de inhibición a los 1000 µg/ml, valor que es el doble de la concentración necesaria para que el extracto acuoso inhiba totalmente la actividad de la G6Pasa.

El ácido clorogénico (en verde) tuvo un buen porcentaje de inhibición (72 %) lo que nos indica que, en los microsomas utilizados, el sistema G6Pasa estaba activo. Su IC₅₀ fue de 246 µg/ml

Cecropia obtusifolia

Los valores de la regresión lineal para el extracto BuOH fueron: IC₅₀ de 125 µg/ml, pendiente de -0.27, ordenada al origen de 1 y su coeficiente de correlación de -0.95; mientras que los valores obtenidos para el extracto Aq fueron: IC₅₀ de 218 µg/ml, pendiente de -0.36, ordenada al origen de 1.12 y su coeficiente de correlación de -0.97.



Graf. 3 Aquí se muestra el porcentaje de actividad del sistema G6Pasa a diferentes concentraciones de los extractos probados de *C. obtusifolia*, en rojo se muestra el BuOH, en azul el Aq y en verde el CGA, todos los datos muestran la media más su desviación estándar. El valor obtenido para la IC_{50} fue de 125 µg/ml para el extracto BuOH, de 218 µg/ml para el extracto acuoso y para el CGA de 246 µg/ml.

En la gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos para los extractos de *C. obtusifolia*, para el extracto BuOH (en rojo) se ve que el porcentaje de inhibición empieza a aumentar a una concentración de 20 µg/ml e inhibe el 100% de actividad del sistema enzimático a una concentración de 1500 µg/ml aproximadamente.

Para el extracto Aq (en azul) el porcentaje de inhibición aumenta de forma ligeramente más paulatina que para el extracto BuOH, aunque a los 500 µg/ml la actividad se mantiene y continúa aumentando a concentraciones mayores, pero no llega a inhibir el sistema al 100%.

Para los extractos de esta especie la IC_{50} menor corresponde al extracto que presenta la mejor inhibición, o sea el extracto BuOH.

El ácido clorogénico (en verde) tuvo un buen porcentaje (73 %) de inhibición lo que nos indica que, en los microsomas utilizados, el sistema G6Pasa estaba activo. Su IC_{50} fue de 246 $\mu\text{g/ml}$.

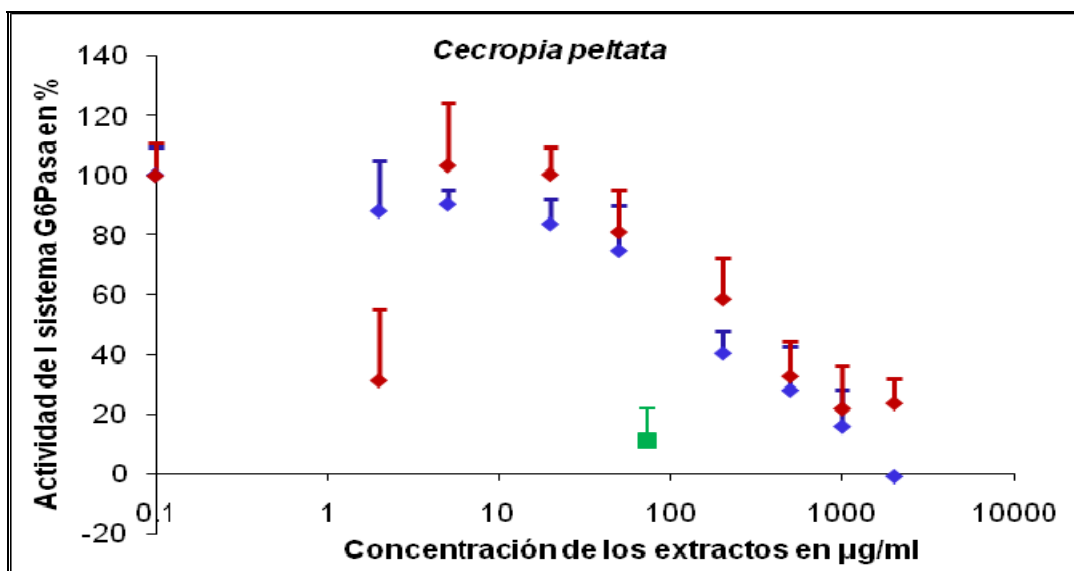
Cecropia peltata

Los valores de la regresión lineal para el extracto BuOH fueron: IC_{50} de 125 $\mu\text{g/ml}$, pendiente de -0.28, ordenada al origen de 0.95 y su coeficiente de correlación de -0.98; mientras que los valores obtenidos para el extracto Aq fueron: IC_{50} de 218 $\mu\text{g/ml}$, pendiente de -0.27, ordenada al origen de 1 y su coeficiente de correlación de -0.97.

En la gráfica 4 se muestran los resultados obtenidos para los extractos de *C. peltata*, para el extracto BuOH (en rojo) la inhibición empieza a los 50 $\mu\text{g/ml}$ pero la inhibición de este extracto no llega al 100% su máximo nivel lo alcanza a los 1000 $\mu\text{g/ml}$ y a los 2000 $\mu\text{g/ml}$ se presenta una ligera disminución de su actividad.

Para el extracto Aq (en azul) la inhibición se ve a partir de los 50 $\mu\text{g/ml}$ y continúa hasta llegar al 100% a una concentración de 2000 $\mu\text{g/ml}$, el aumento en la actividad del extracto parece igual de rápida que la del extracto BuOH a pesar de que este último tiene una IC_{50} menor, además la inhibición por parte del extracto Aq llega al 100% a los 2000 $\mu\text{g/ml}$.

El ácido clorogénico (en verde) tuvo un buen porcentaje de inhibición (73 %) lo que nos indica que, en los microsomas utilizados, el sistema G6Pasa estaba activo. Su IC₅₀ fue de 246 µg/ml



Graf. 4 Aquí se muestra el porcentaje de actividad del sistema G6Pasa a diferentes concentraciones de los extractos probados de *C. peltata*, en rojo se muestra el BuOH, en azul el Aq y en verde el CGA, para todos sus medias más su desviación estándar. El valor obtenido para la IC₅₀ fue de 41 µg/ml para el extracto BuOH, de 111 µg/ml para el extracto acuoso y de 246 µg/ml para el CGA.

DISCUSIÓN

Tournefortia hirsutissima

Los resultados obtenidos para los extractos de *Tournefortia hirsutissima* en la prueba *in vitro*, de inhibición de la G6Pasa (graf. 2), muestran que, a pesar de que el extracto BuOH tiene una IC_{50} menor que la del extracto Aq, su actividad inhibitoria se incrementa más lentamente mientras mayor es la concentración. Esto puede deberse a las diferencias en el contenido químico de los extractos, también puede deberse a diferencias en las concentraciones de los compuestos activos (Ortiz-Andrade *et al.* 2006); o bien al tipo de inhibición presentando. Quizás sea irreversible para el extracto Aq, pues la actividad inhibitoria de este extracto llega al 100%, o reversible competitiva para el BuOH, pues la gráfica muestra una saturación del sistema enzimático a altas concentraciones (Leghninger *et al.* 1995).

Esto podría explicar porque en la prueba *in vitro* el extracto acuoso provoca una inhibición del 100% a concentraciones elevadas sin provocar la saturación del sistema enzimático así como por qué, a pesar de tener una IC_{50} de más del doble que la obtenida para el extracto BuOH, la actividad inhibitoria aumenta de forma más pronunciada.

Por otra parte el extracto BuOH de esta planta, probado en la prueba de tolerancia a piruvato (graf. 1), presentó un efecto significativo con respecto al grupo control diabético, ya que el aumento de los niveles de glucosa plasmática, para este grupo, fueron mucho menores que los del control diabético. Sin embargo su efecto fue más tardío y moderado con respecto al del grupo tratado con ácido clorogénico. Esta diferencia era esperada puesto que en el análisis químico del extracto no se encontraron ni ácido clorogénico ni

iso-orientina (crom. 1), pero lamentablemente los tres compuestos presentes en este extracto aun no han sido caracterizados. Se requieren más estudios para analizar la química de esta planta y establecer los compuestos activos.

Estos resultados muestran que *T. hirsutissima* inhibe la gluconeogénesis, pero no se descarta que, en un organismo no manipulado en laboratorio, tenga otros mecanismos para disminuir la hiperglucemia característica de la diabetes como: la inhibición de la glucogenólisis o el aumento de la glucogénesis (Wu *et al.* 2005), o bien, como estimulador de la secreción de insulina o provocando una disminución de la resistencia periférica de la misma (Andrade-Cetto *et al.* 2007b).

Es importante probar los extractos de la planta en modelos para estos mecanismos de acción para saber cuál es el que confiere principalmente la actividad hipoglucemiante a la planta. También se puede probar su efecto sobre la absorción intestinal de glucosa para comprobar si, al igual que *T. hartwegiana* una especie de la misma familia, presenta efecto como inhibidor de las α -glucosidasas (Ortíz-Andrade *et al.* 2006).

Cecropia obtusifolia

Los resultados obtenidos para los extractos de *C. obtusifolia* en la prueba *in vitro* sobre la actividad de la G6Pasa (graf. 2) muestran que, como esperábamos, el extracto BuOH tiene una mejor inhibición que el extracto Aq, lo cual concuerda con los valores obtenidos de las IC_{50} y esto puede deberse a que los compuestos activos están más concentrados en el extracto BuOH que en el Aq (Andrade-Cetto *et al.* 2001).

En la prueba *in vivo*, prueba de tolerancia a piruvato, el extracto BuOH de esta planta (graf. 1) evita la hiperglucemia y tiene un efecto mayor que el del grupo tratado con ácido

clorogénico, lo cual nos indica que además del ácido clorogénico hay otro/s compuestos involucrados en el efecto de esta planta, el cual puede ser la iso-orientina que comprobamos está presente en el extracto utilizado (crom. 2) y que fue reportada como posible principio activo por Andrade-Cetto *et al.* en 2001 y Nicasio *et al.* 2005.

El extracto BuOH de esta planta, al igual que el de *T. hirsutissima*, podría estar involucrado en otros mecanismos de acción para disminuir la hiperglucemia característica de la diabetes (Andrade-Cetto *et al.* 2007a).

Crecopia peltata

Los resultados obtenidos para los extractos de *C. peltata* en la prueba *in vitro* sobre la actividad de la G6Pasa (graf. 3) muestran que, a pesar de que el extracto BuOH tiene una IC₅₀ menor, este no presenta una inhibición del 100% como la que presenta su extracto Aq, lo cual puede deberse a diferencias en la concentración de los compuestos activos en los diferentes extractos que, al ser elevadas a 2000 µg/ml en el extracto BuOH, saturan el sistema enzimático, lo cual no pasa en el extracto Aq que si tiene una inhibición del 100% sobre el sistema G6Pasa (Leghninger *et al.* 1995). Como se señaló para *T. hirsutissima* estos resultados también puede deberse a una diferencia en la composición química de los extractos (Andrade-Cetto *et al.* 2001 y Nicasio *et al.* 2005) que no fue detectada en nuestro análisis.

Por otro lado en la prueba *in vivo*, prueba de tolerancia a piruvato, el extracto BuOH de esta planta (graf. 1) fue, de los tres extractos probados, el que tuvo los mejores resultados, ya que baja los niveles de glucosa más allá de los niveles basales y lo hace en menor tiempo. Sin embargo el aumento de los niveles de glucosa plasmática, al final del

experimento, pueden deberse a que el organismo ya haya metabolizado la mayor parte del extracto y la actividad comience a disminuir (Lehninger *et al.* 1995).

La actividad elevada de *C. peltata* en la prueba de tolerancia a piruvato podría indicar que el extracto BuOH de esta planta no solo actúa sobre la glucosa-6-fosfatasa si no que también puede estar involucrada en la inhibición de otras enzimas gluconeogénicas como la PEPCK y la FBPasa o, incluso, que puede actuar sobre la ruta de la glucogénesis (Wu *et al.* 2005).

Para las tres plantas falta establecer el tipo de inhibición sobre el sistema enzimático G6Pasa, y si inhiben otras enzimas gluconeogénicas como PEPCK y FBPasa. Así mismo se requiere establecer una curva dosis-respuesta en la prueba de tolerancia a piruvato para ver los efectos máximos de los extractos y comparar entre las plantas estudiadas.

Estudios en perfusión de hígado, como los realizados con ácido clorogénico (Arion *et al.* 1997 y Khan, 1998), podrían separar los efectos exclusivos sobre la gluconeogénesis, de una posible estimulación de la secreción de insulina o una disminución de la resistencia periférica de la misma.

CONCLUSIONES

- ✓ El extracto BuOH de *Tournefortia hirsutissima* inhibe la actividad del sistema G6Pasa en el ensayo *in vitro*.
- ✓ El extracto Aq de *Tournefortia hirsutissima* tiene una mayor actividad inhibitoria sobre el sistema G6Pasa que su extracto BuOH.
- ✓ El extracto BuOH de *Tournefortia hirsutissima* disminuye la hiperglucemia en la prueba de tolerancia a piruvato pero, de las plantas probadas, es la que tiene menor efecto.
- ✓ Los extractos BuOH's y Aq's de ambas especies de *Cecropia* son inhibidores del sistema G6Pasa.
- ✓ Los extractos BuOH's completos, de ambas especies de *Cecropia*, tienen un mejor efecto hipoglucemiante, en la prueba de tolerancia a piruvato, que el ácido clorogénico puro.
- ✓ De los extractos probados el extracto BuOH de *Cecropia peltata* es el que disminuye de manera más efectiva la hiperglucemia en la prueba de tolerancia piruvato.
- ✓ La cantidad de ácido clorogénico presente en los extractos BuOH's de las *Cecropia* no es suficiente para explicar su efecto hipoglucemiante.

- ✓ La inhibición de la gluconeogénesis hepática puede ser el principal mecanismo por el que ambas especies de *Cecropia* presentan un efecto hipoglucemiante.
- ✓ El ácido clorogénico no parece ser un compuesto indispensable en la inhibición de la gluconeogénesis hepática presentada por los extractos probados.
- ✓ Las tres especies de plantas tienen efecto inhibitorio sobre la gluconeogénesis hepática. Aunque otros mecanismos de acción, como la estimulación de liberación de insulina o el aumento en la ruta metabólica de glucogénesis, no son descartados.

REFERENCIAS

- ADA. 2008. American Diabetes Association. Página de Red: www.diabetes.org.
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jacquez P y López ME. 1996. Plantas medicinales del herbario IMSS, Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. Edit. Instituto Mexicano del Seguro Social. 218 pp.
- Alarcon- Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Pérez- Gutierrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores-Saenz JL. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. 61:101-110.
- Andrade- Cetto A y Hienrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99:325-48.
- Andrade-Cetto A, Cárdenas R y Ramirez-Reyes B. 2007a. Hypoglycemic effect of *Cecropia peltata* L. on n5-STZ type 2 diabetic rats. *Pharmacologyonline* 3:203-210.
- Andrade-Cetto A, Revilla-Monsalve C, Wiedenfeld H. 2007b. Hypoglycemic effect of *Tournefortia hirsutissima* L, on n-streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 112(1):96-100.
- Andrade-Cetto A. and Wiedenfeld H. 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 78:145-149.
- Argueta A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. INI, México. 3 Tomos.
- Arion WJ, Canfield WK, Ramos FC, Schindler PW, Burguer HB, Hemmerle H, Schubert G, Below P, Herling AW. 1997. Chlorogenic acid and

hidroxitrobenzaldehyde: New Inhibitors of Hepatic Glucose 6-Phosphatase. Archives of Biochemistry and Biophysics. 339(2):315-322.

- Arion WJ. 1987. Measurement of Intactness of Rat Liver Endoplasmic Reticulum. Methods in Enzymology. 174: 58-67.
- Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. 1996. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. Experimentia. 52:344-347.
- Cori GT. y Cori C. F. 1952. Glucose-6-Phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. Biol. Chem.* 199:661-667.
- Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. 1995. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and metyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6- alkylating ability. Biochemical Pharmacology. 50: 2015-2020.
- Delcy V, Rodriguez de Sotillo, Hadley M. 2002. Chologenic acid plasma and liver concentrations of: colesterol, triacylglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. Journal of Nutritional Biochemistry. 13: 717-726.
- Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin diabetes. Diabetes. 25: 595-603.
- Fisicanet: Página de red: www.fisicanet.com.ar
- FMD.2008. Federación Mexicana de Diabetes. Página de Red: www.fmd.gob.mx
- Foster JD y Nordlie RC. 2002. The Biochemistry and Molecular Biology of the Glucose-6-Phosphatase System. Experimental Biology and Medicine. 227(8):601–608.

- Gaedck, F. y Steinhoff, B. 2003. Herbal Medicinal Products. CRS press, Germany, pp. 200.
- Giroix MH, Portha B, Kergoat M, Bailbe D, Picon L. 1983. Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes: a study with the perfused pancreas. *Diabetes*. 32:445-451.
- Hadden DR. 2005. Goat's rue – French lilac – Italian fitch – Spanish sainfoin: *gallega officinalis* and metformin: The Edinburgh connection. *Journal Royal College of Physicians of Edinburgh*. **35**:258–260
- Hadden JR 2005. Goat's rue – French lilac – Italian fitch –Spanish sainfoin: *gallega officinalis* and metformin: The Edinburgh connection. *The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. **35**:258–260
- Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jalowy A, Muller M, Burkart V, Kolb H, Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 375: 597-602.
- Hemmerle H, Burguer HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, Paulus E and Herling AW. 1997. Chlorogenic acid and Synthetic Chlorogenic acid derivatives: Novel Inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Journal Medicinal Chemistry*. 40(2): 137-143.
- Holmstedt BO y Bruhn JG. 1983. Etnopharmacology- a challenge. *Journal of Etnopharmacology*. 8:251-256.
- lesmonterroso página Página de red:
<http://iesmonterroso.org/recursos/digestivoindex.htm/>
- Islas-Andrade, Revilla Monsalve M.C, Escobedo de la Peña J, Polanco A.C, Palomino MA, Feria Velasco A. 2000. Streptozotocin and alloxan in experimental

diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochemical Cytochemical*, 33(3):201-208.

- Kempfer B, Cassolla P, Borba-Murad G R, Constantin J, Salgueiro- Pagadigorria C L, Barbosa R. 2008. Chologenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycemia. *Cell Biochemistry Function*. 26(3):320-328.
- Khan A, Ling ZC, Pukk K, Herling AW, Landau BR, Efendic S. 1998. Effects of 3-mercaptopicolinic acid and a derivative of chologenic acid (S-3483) on hepatic and islet glucose-6-phosphatase activity. *European Journal of Pharmaceutical*. 349:325-331.
- Krôncke, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. 1995. Nitric oxide generation during cellular metallization of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 376(3):179- 185.
- Kuklinski C. 2000. *Farmacognosia, estudio de las drogas y las sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones OMEGA, Barcelona. pp. 515
- Lehninger, Nelson, Cox. 1995. *Principios de bioquímica*, Edit. OMEGA, pp 1012
- Miyake K, Ogawa W, Matsumoto M, Nakamura T, Sakaue H, Kasuga M. 2002. Hyperglycemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*. 110:1483-1491.
- Moller DE. 2001. New drug targets for Type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*. 414:821-827.
- Mooradian AD. 1996. Drug therapy of non-insulin- dependent diabetes mellitus in elderly. *Drugs*. 51: 931-941.

- Nakatsuka M, Sakurai H, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. 1998. Enhancement by streptozotocin of O₂- radical generation by the xanthine oxidase system of pancreatic beta-cells. *FEBS Lett.* 239:295-298.
- Nicasio P, Aguilar-Santamaría, Aranda E, Ortiz S, González M. 2005. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropias* species. *Phytoterapy Research.* 19:661-664.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. 1990a. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *Journal of Pharmacobio-dynamics.* 13(4): 259-262.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. 1990b. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *Journal Endocrinology.* 127: 161-165.
- Ortíz-Andrade RR, García-Jiménez, Castillo.España P, Ramírez-Ávila G, Villalobos-Medina R y Estrada-Soto S. 2006. α -Glucosidase inhibitory activity of methanolic extract from *Tournefortia harwegtiana*: An anti-hyperglycemic agent. *Journal of Ethnopharmacology* 190: 400-405
- Ortíz-Andrade RR, Rodríguez-López V, Garduño-Ramírez ML, Castillo.España P y Estrada-Soto S. 2005. Anti-diabetic effect on alloxan and normoglycemic rats and some pharmacological evaluations of *Tournefortia harwegtiana*. *Journal of Ethnopharmacology.* 101: 37-42.
- Pennington TD y Sarukan K. 1998. árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM Instituto de Ecología-Fondo de Cultura Económica.12:253-262 y 708-710.
- Portha B, Giroix MH, Serradas P, Movassat J, Bailbe D, Kergoat M. 2001. The neonatally streptozotocin- induced (n-STZ) diabetic rats, a family of NIDDM

models. 247-271p. en: Anders, A. Sima, F. y Shafrid, E. (EDS, Animal Model of diabetes Aprimer, HARWOOD academic publishers), pp. 364.

- Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. 1974. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes* 23:889-895.
- Portha B, Picon L, Rosselin G. 1979. Chemical diabetes in the adult rats as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetología* 17:371-377.
- Pullman ME. 1967. Measurement of ATPase and $^{32}\text{P}_i$ exchange reaction. *Methods in Enzymology*. 10: 57-60.
- Revilla MC, Andrade-Cetto A, Palomino-Garibay MA, Wiedenfeld H e Islas-Andrade S. 2007. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. *Journal of Ethnopharmacology*. 11(3):636-640.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Partida-Hernández G, Lara-Lemus A y Alarcón-Aguilar F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica*. 22(1):87-93.
- Ross SA, Gulve EA and Wang M. 2004. Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes. *Chemical Reviews*. 104:1255-1282.
- Sandler S, Swenne I. 1983. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetología* 25:444-447.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. 50:536-546.
- Takasu N, Komiya I, Nagasawa Y, Yamada T. 1991b. Streptozotocin- and alloxan-induced H_2O_2 generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H_2O_2 as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 40:1141-1145.
- Trejo GM. 1983. Estudio fitoquímico del Guarumbo (*Cecropia obtusifolia*) como agente hipoglucemiante. Tesis de licenciatura. ENCB, INP. 55p.

- Turk, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. 1993. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 197:1458-1464.
- We E, Simon OR, Moorrison EY. 1996. Strptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose whitin six hours of inyection into rats. *West Indian Medical Journal*. 45:60-62.
- WHO. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 59pp.
- WHO. 2008. World Health Organization. Página de Red: www.who.int.
- Wickberg B. 1993. Chemical methods in Ethnopharmacology. Elsevier Scientific Publishers Ireland. pp 139-165.
- Wu C, Okar DA, Kang J y Lange AJ. 2005. Reduction of Hepatic Glucose Production as a Therapeutic Target in the Treatment of Diabetes. *Endocrine, Metabolic and Inminne Disorders*.5:51:59.

TABLA DE CONTENIDO

FIGURAS

Figura 1 *Cecropia obtusifolia* Berol

Figura 2 *Cecropia peltata* L

Figura 3 *Tuornefortia hirsutissima* L

Figura 4 Hipoglucemiantes orales y su blanco de acción

Figura 5 Rutas opuestas gluconeogénesis y glucólisis

Figura 6 Esquema de la ruta de glucólisis

Figura 7 Reacciones de rodeo de la gluconeogénesis

Figura 8 Esquema del sistema G6Pasa

Figura 9 Mecanismos por los que la STZ provoca citotoxicidad en células β pancreáticas de rata

Figura 10 Fórmula estructural del ácido clorogénico

Figura 11 Soxhlet

CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1 *C. obtusifolia*

Cromatograma 2 *C peltata*

Cromatograma 3 *T. hirsutissima*

GRÁFICAS

Gráfica 1 Prueba *in vivo* para todos los extractos probados

Gráfica 2 Prueba *in vitro* para T. hirsutissima

Gráfica 3 Prueba *in vitro* para C. obtusifolia

Gráfica 4 Prueba *in vitro* para C. peltata