



---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**T E S I S:**

**"Caracterización del principio activo hipoglucemiante  
del berro (*Nasturtium officinale*)".**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**P R E S E N T A:**

**Química farmacobióloga  
Andrea Gissel Rico Pedraza**

**Dirección de Tesis:  
Doctora en Ciencias Fisiológicas  
Bertha Fenton Navarro**

**Morelia, Michoacán.  
México  
Agosto 2018**



El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”  
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
aprobó la tesis presentada por:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA  
ANDREA GISSEL RICO PEDRAZA

Doctor en Ciencias Biomédicas  
Edgar Vázquez Contreras  
Universidad Autónoma Metropolitana

---

Doctora en Ciencias Biomédicas  
Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

Doctor en Ciencias Químico Biológicas  
Sergio Gutiérrez Castellanos  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

Doctor en Ciencias en Biología Experimental  
Christian Cortes Rojo  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado  
Maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad – CONACYT  
como programa Consolidado

La autora de esta tesis, estudiante de la  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
agradece al CONACyT la beca que le fue otorgada  
para la realización de la Maestría en Ciencias de la Salud.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la D.C Bertha Fenton Navarro, porque sin su asesoría y apoyo, esta meta no se hubiera podido realizar, por compartir conmigo todos sus conocimientos, por siempre tener una recomendación o una experiencia que contar, porque siempre estuvo al pendiente de mis necesidades y me alentó a realizar todo de la mejor manera y dar lo mejor de mí.

A mi comité tutorial, el D.C. Edgar Vázquez Contreras, el D.C. Sergio Gutiérrez Castellanos, la D.C. Graciela Letechipía Vallejo y el D.C. Christian Cortés Rojo, por sus observaciones y contribuciones que fueron de gran ayuda en la realización de este trabajo.

A mis profesores, porque en cada una de sus clases nos proporcionaban innumerables conocimientos.

A mis papas, hermanos y sobrinos por apoyarme en cada decisión y en cada nuevo proyecto, por su amor, su paciencia y su tolerancia, por escucharme y preocuparse por mí, por ser siempre incondicionales para mí en cada momento, por inspirarme a ser siempre mi mejor versión.

A Gregorio Luna, por estar conmigo desde el inicio de este proyecto, por escucharme, alentarme, aconsejarme y acompañarme día a día, por impulsarme a ser una mejor persona y ayudarme de todas las maneras posibles a alcanzar cada uno de mis propósitos.

A mis amigos y compañeros de posgrado, por todos los momentos felices que compartimos, en especial a Lilia Salazar, Karina Tenorio y Socorro Escamilla por la amistad incondicional que desde un principio me brindaron, por hacer más amenas las horas de trabajo y compartir conmigo tanto.

A mis amigos de Servimed, por su confianza durante este proceso, porque compartieron conmigo mis buenos y malos momentos y siempre estuvieron para mí, sin su apoyo no hubiera sido posible la realización de esta meta.

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CTOG</b>	Curva de tolerancia oral a la glucosa
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>EA</b>	Eficiencia antirradical
<b>FPL</b>	Fracción post-lavados
<b>IR</b>	Receptor de insulina
<b>IRS</b>	Sustrato de receptor de insulina
<b>kDa</b>	Kilo dalton
<b>MAPK</b>	Vía de las cinasas activadas por mitógenos
<b>mgEAG/g</b>	Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto
<b>mgEF/g</b>	miligramos equivalentes de floroglucinol por gramo de extracto
<b>mgEQ/g</b>	miligramos equivalentes de quercetina por gramo de extracto
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora
<b>PI3K</b>	Vía del fosfatidilinositol 3-cinasa
<b>PPI</b>	Péptido parecido a la insulina
<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirrolidona
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RTK</b>	Receptor tirosina cinasa
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

## GLOSARIO DE TERMINOS

<b>Acromegalia</b>	Secreción excesiva de hormona de crecimiento
<b>Aldosteronoma</b>	Adenoma de la corteza suprarrenal
<b>Apoptosis</b>	Muerte célula programada
<b>Cetoacidosis</b>	Elevación de la concentración de cuerpos cetónicos
<b>Fitoterapia</b>	Uso de productos de origen vegetal para la prevención, curación o alivio de enfermedades
<b>Glaucoma</b>	Enfermedad asociada al nervio óptico, generada por el aumento de la presión intraocular
<b>Glucemia</b>	Presencia de glucosa en sangre
<b>Glucosuria</b>	Presencia de glucosa en orina
<b>Hiperglucemia</b>	Aumento anormal de los valores de glucosa en sangre
<b>Hipoglucemiante</b>	capacidad de disminuir los valores de glucosa en sangre
<b>Polidipsia</b>	Necesidad exagerada de beber agua
<b>Polifagia</b>	Sensación incontenible de hambre
<b>Poliuria</b>	Excreción muy abundante de orina
<b>Somatostinoma</b>	Tumor maligno que se desarrolla por la proliferación de células delta producidas en páncreas, estómago y colon

## ÍNDICE GENERAL

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1 DIABETES</b>	1
<b>1.2 CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES</b>	2
1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1	2
1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2	2
1.2.3 Diabetes mellitus gestacional	3
1.2.4 Otros tipos específicos de diabetes	3
<b>1.3 EL PÁNCREAS</b>	4
<b>1.4 LA INSULINA</b>	4
1.4.1 Vía de señalización de las cinasas activadas por mitógenos	7
1.4.2 Vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa	8
1.4.3 Regulación del transporte de glucosa	10
1.4.4 Resistencia a la insulina	10
<b>1.5 TRATAMIENTO</b>	12
<b>1.6 COMPLICACIONES</b>	14
<b>1.7 PLANTAS HIPOGLUCEMIANTES</b>	15
<b>1.8 COMPONENTES HIPOGLUCEMIANTES EN PLANTAS MEDICINALES</b>	17
1.8.1 Fenoles y flavonoides	17
1.8.2 Alcaloides	19
1.8.3 Terpenoides y esteroides	20
1.8.4 Polisacáridos	21
1.8.5 Péptidos	21
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	24
<b>2.1 BERRO</b>	24
<b>III.- JUSTIFICACIÓN</b>	26
<b>IV.- HIPÓTESIS</b>	28
<b>V.- OBJETIVO GENERAL</b>	28
<b>VI.- OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	28
<b>VII.- MATERIALES</b>	29
<b>VIII.- MÉTODOS</b>	29
Obtención del extracto acuoso	29

Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos.	29
Obtención de la fracción post-lavados.	29
Determinación de fenoles totales.	30
Determinación de polifenoles.	30
Determinación de flavonoides.	31
Determinación de actividad antioxidante.	31
Ensayo de Benedict.	32
Determinación de Concentración de Proteínas	32
Liofilización.	33
Cromatografía de exclusión molecular.	33
Electroforesis SDS-PAGE.	34
Modelo animal.	35
Inducción a diabetes experimental tipo 1	36
Inducción a diabetes experimental tipo 2	36
Diseño experimental.	37
Curva de tolerancia a la glucosa	37
Análisis estadístico.	37
<b>IX.- RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>X.- DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>XI.- CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>XII.- PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>
<b>XIII.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>76</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1</b>	Síntesis de insulina	5
<b>2</b>	Estructura receptor de insulina	7
<b>3</b>	Activación de la vía de las MAPK	8
<b>4</b>	Activación de la vía de PI3K	9
<b>5</b>	Cromatograma representativo de los fenoles cuantificados en la FPL	42
<b>6</b>	Cromatograma representativo de los flavonoides cuantificados en la FPL	43
<b>7</b>	Cromatograma representativo de los carbohidratos cuantificados en la FPL	44
<b>8</b>	Patrón de elución de la Insulina	46
<b>9</b>	Cromatograma representativo de las proteínas cuantificados en la FPL	46
<b>10</b>	Electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la FPL	47
<b>11</b>	Electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras de la FPL	48
<b>12</b>	Electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras de proteínas de la FPL	49
<b>13a</b>	CTOG con Fenoles en DM1	52
<b>13b</b>	Normalización de datos de CTOG con Fenoles en DM1	53
<b>14a</b>	CTOG con Fenoles en DM2	55
<b>14b</b>	Normalización de datos de CTOG con Fenoles en DM2	56
<b>15a</b>	CTOG con flavonoides en DM1	58
<b>15b</b>	Normalización de datos de CTOG con flavonoides en DM1	59
<b>16a</b>	CTOG con flavonoides en DM2	60
<b>16b</b>	Normalización de datos de CTOG con flavonoides en DM2	60
<b>17a</b>	CTOG con PPI en DM1	63
<b>17b</b>	Normalización de datos CTOG con PPI en DM1	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>1</b>	Diferentes tipos de insulina utilizados en el tratamiento de DM1	12
<b>2</b>	Fármacos hipoglucemiantes utilizados en el tratamiento de DM2	13
<b>3</b>	Contenido de fenoles totales en extractos de berro.	38
<b>4</b>	Contenido de polifenoles en extractos de berro.	39
<b>5</b>	Contenido de flavonoides totales en extractos de berro.	39
<b>6</b>	Actividad antioxidante en extractos de berro	40
<b>7</b>	Contenido de carbohidratos en extractos de berro	41
<b>8</b>	Concentración de los distintos compuestos presentes en la FPL del berro	45
<b>9</b>	Grupos experimentales CTOG con fenoles en DM 1 y 2	50
<b>10</b>	Porcentaje de reducción y área bajo la curva de CTOG con fenoles en DM1	54
<b>11</b>	Porcentaje de reducción y área bajo la curva de CTOG con fenoles en DM2	56
<b>12</b>	Grupos experimentales CTOG con flavonoides en DM 1 y 2	54
<b>13</b>	Porcentaje de reducción y área bajo la curva de CTOG con flavonoides en DM1	59
<b>14</b>	Porcentaje de reducción y área bajo la curva de CTOG con flavonoides en DM2	61
<b>15</b>	Grupos experimentales CTOG con PPI en DM1	62
<b>16</b>	Porcentaje de reducción y área bajo la curva de CTOG con PPI en DM1	64

## RESUMEN

La diabetes mellitus representa actualmente uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Los tratamientos médicos para el control de la diabetes se basan generalmente en hipoglucemiantes orales, tales como las sulfonilureas y biguanidas, así como el uso de insulina. Sin embargo, el uso prolongado de los hipoglucemiantes orales causa efectos secundarios adversos, lo que conlleva a poco apego al tratamiento. El consumo de plantas medicinales ha ofrecido una alternativa de fácil manejo y con menos efectos secundarios adversos. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado en modelos experimentales con animales de laboratorio que las hojas del berro (*Nasturtium officinale*) ejercen un efecto hipoglucemiante, por tal motivo es de suma importancia identificar y caracterizar el componente activo de ésta planta que no ha sido estudiada previamente. **Objetivo:** Identificar el compuesto activo hipoglucemiante del berro (*Nasturtium officinale*). **Material y métodos:** Berro (*Nasturtium officinale*). Se obtuvieron el extracto acuoso, pigmentos acetónicos y alcohólicos de las hojas del berro así como la fracción post-lavados (FPL), a los que se les determinó la concentración de fenoles, polifenoles y flavonoides, además de la actividad antioxidante, así como la cuantificación de carbohidratos. Se evaluó la actividad hipoglucemiante de fenoles, flavonoides y proteínas presentes en la FPL en un modelo de ratas inducidas a diabetes tipo 1 y 2. **Resultados:** Se obtuvo una mayor concentración de compuestos fenólicos en el pigmento alcohólico. Se realizó la determinación de la actividad antioxidante con los parámetros de IC<sub>50</sub>, T<sub>EC50</sub> y eficiencia antirradical, donde el pigmento acetónico mostró una mayor actividad antioxidante. La mayor concentración de carbohidratos se obtuvo en el extracto alcohólico. Se realizaron cromatografías de exclusión molecular de la FPL para iniciar la purificación del componente activo del berro y a partir de las fracciones obtenidas se cuantificaron fenoles, polifenoles, flavonoides y carbohidratos. Se obtuvo el patrón de elución de las proteínas de la fracción sin pigmentos y se comparó con el patrón de elución de la insulina. Se realizó electroforesis SDS-PAGE para obtener el peso molecular aparente de las proteínas obtenidas por cromatografía. Se realizó la evaluación de la actividad hipoglucemiante de diferentes componentes activos presentes en la FPL del berro, realizando curvas de tolerancia a la glucosa utilizando la fracción sin pigmentos, donde se obtuvo un porcentaje de reducción diabetes tipo 1 de 30% para fenoles, 60% para flavonoides y de 22% para el péptido parecido a la insulina, mientras que en el modelo experimental de diabetes tipo 2 se evaluó fenoles y flavonoides obteniéndose una reducción de 15% y 14% respectivamente. **Conclusiones:** El berro contiene más de un componente activo hipoglucemiante, entre los que destacan fenoles, flavonoides y proteínas, los cuales al ser probados en modelos experimentales de diabetes tipo 1 y tipo 2 se comporta de manera similar a los fármacos más utilizados en el tratamiento de diabetes como lo son la insulina y la metformina.

**Palabras clave:** Diabetes mellitus, berro, compuestos hipoglucemiantes.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus currently represents one of the main public health problems worldwide. Medical treatments for the control of diabetes are usually based on oral hypoglycemic agents, such as sulfonylureas and biguanides, as well as insulin. However, prolonged use of oral hypoglycemic agents causes adverse side problems, which leads to some abuse of treatment by patients with diabetes. The consumption of medicinal plants has an alternative of easy handling and with adverse secondary problems. In our working group it has been gained in experimental models with laboratory animals that the watercress leaves (*Nasturtium officinale*) exert a hypoglycaemic effect, for this reason it is important the identification and the active component of this plant that has not been previously studied. **Objective:** to purify and characterize the hypoglycaemic active compound of watercress (*Nasturtium officinale*). **Material and methods:** Watercress (*Nasturtium officinale*). The aqueous extract, acetone and alcoholic pigments of the watercress leaves, as well as the post-washed fraction (FPL), were obtained, to which the concentration of phenols, polyphenols and flavonoids, as well as the antioxidant activity, are determined. The quantification of carbohydrates. The hypoglycaemic activity was evaluated in a model of rats induced to experimental diabetes type 1 and 2 of phenols, flavonoids and proteins present in the FPL. **Results:** A higher concentration of phenolic compounds in the alcoholic pigment was obtained. The determination of the antioxidant activity was performed with the parameters of  $IC_{50}$ ,  $T_{EC50}$  and antiradical efficiency, where the acetic pigment showed a greater antioxidant activity. The highest concentration of carbohydrates was obtained in the alcoholic extract. Chromatographies of molecular exclusion of the pigment fraction are carried out to initiate the purification of the active component of the cress and phenols, polyphenols, flavonoids and carbohydrates were quantified from the fractions of origin. The elimination pattern of the proteins of the non-pigment fraction was obtained and compared with the elution pattern of the insulin. SDS-PAGE electrophoresis was performed to obtain the apparent molecular weight of the proteins by chromatography. The evaluation of the hypoglycaemic activity of different active components present in the FPL of the cress was made, obtaining a percentage of reduction of type 1 diabetes of 30% for phenols, 60% for flavonoids and 22% for the episode similar to insulin, while in the experimental model of type 2 diabetes, phenols and flavonoids were evaluated, obtaining a reduction of 15% and 14% respectively. **Conclusions:** Watercress contains components of an active hypoglycaemic component, among which are phenols, flavonoids and proteins, which, when tested in experimental models of type 1 and type 2 diabetes, behave similarly to the most commonly used drugs. The treatment of diabetes such as insulin and metformin.

**Key words:** Diabetes mellitus, watercress, hypoglycemic compounds.

## **I.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1 DIABETES**

La diabetes mellitus es un grupo de alteraciones metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia crónica, debida a un defecto en la secreción de la insulina, a un defecto en la acción de la misma, o a ambas. Además de la hiperglucemia, coexisten alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de las proteínas. La hiperglucemia se asocia con daño y disfunción de varios órganos y sistemas, especialmente riñones, ojos, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Amaya-Chávez y col, 2007). Clínicamente la diabetes se caracteriza por el aumento de la glucosa en sangre (glicemia), en la orina (glucosuria), aumento en la cantidad de orina (poliuria), sed (polidipsia) y hambre (polifagia) (Harris, 1996).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2014, el 9% de los adultos (18 años o mayores) tenía diabetes. En 2015 fallecieron 1.5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes. Más del 80% de las muertes por diabetes se registra en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2015). En México, a partir del 2000, la diabetes es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (después de la cardiopatía isquémica, enfermedad resultante muchas veces de la diabetes) (SSA, 2006).

La diabetes mellitus produce gran cantidad de complicaciones agudas y crónicas, la mayor parte puede evitarse o modificarse. Su identificación en la etapa inicial es importante, ya que así puede cambiarse el curso de la enfermedad (Foster, 1999). En etapas avanzadas las complicaciones crónicas más frecuentes son: microangiopáticas, en especial renales y oculares; macroangiopáticas con afectación de arterias coronarias; enfermedad vascular periférica y neuropatía (Islas, 2000).

## **1.2 CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES**

### **1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1**

La diabetes tipo 1 (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia) se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , lo cual ocasiona deficiencia absoluta de insulina, y tendencia a la cetoacidosis (American Diabetes Association, 2010).

La expresión clínica de la enfermedad es variable, se puede presentar con un inicio típico, con las siguientes manifestaciones clínicas: poliuria, polidipsia y pérdida de peso las cuales conforman la triada clásica en el niño, precedido de un período variable asintomático de 2 a 6 semanas (Asenjo y col., 2007). En algunos casos, existe una rápida progresión de los síntomas, como: vómitos, deshidratación, y grados variables de compromiso de conciencia, asociado a cetoacidosis diabética (Silverstein, 2001).

### **1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2**

La diabetes tipo 2 (también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) es la forma de diabetes más común y con frecuencia se asocia a obesidad o incremento en la grasa visceral. Muy raramente ocurre cetoacidosis de manera espontánea. El defecto va desde una resistencia predominante a la insulina, acompañada con una deficiencia relativa de la hormona, hasta un progresivo defecto en su secreción (American Diabetes Association, 2010).

La diabetes tipo 2, presenta un inicio insidioso, con un mínimo de síntomas al diagnóstico y, en el 8 al 25% de los casos puede presentarse como una cetoacidosis. La obesidad y el sobrepeso se observan entre el 85% al 95% de los casos. La diabetes tipo 2 se presenta a una edad más temprana, incluso en la adolescencia y la niñez. Aproximadamente un tercio de los recién diagnosticados en el grupo de edad adolescente es de tipo 2 (Silink, 2002).

### **1.2.3 Diabetes mellitus gestacional**

Agrupación específicamente la intolerancia a la glucosa detectada por primera vez durante el embarazo. La hiperglucemia previa a las veinticuatro semanas del embarazo, se considera diabetes preexistente no diagnosticada (American Diabetes Association, 2010).

### **1.2.4 Otros tipos específicos de diabetes**

Este grupo incluye una amplia variedad de condiciones poco frecuentes como los que se muestran a continuación.

- Defectos genéticos de la función de las células  $\beta$ : están asociados con defectos monogénicos en la función de la célula  $\beta$  que se heredan en un patrón autosómico dominante y caracterizados por hiperglucemia a edades tempranas. Se refiere específicamente a la diabetes tipo 2 en el adulto joven (MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*). La alteración principal es un defecto en la secreción de insulina y no en su acción no son propensos a la cetoacidosis y se controlan con dosis bajas de agentes orales hipoglucemiantes (Bloomgarden, 2009).
- Efectos genéticos en la acción de la insulina: son causas inusuales de diabetes asociadas con mutaciones en el receptor de la insulina, cuya severidad varía desde una modesta hiperglucemia hasta la diabetes severa (Bloomgarden, 2009).
- Enfermedades del páncreas exocrino: pancreatitis, trauma del páncreas, pancreatectomía, neoplasia del páncreas, fibrosis quística, hemocromatosis, entre otros (Kramer y col., 2010).
- Endocrinopatías: acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, hipertiroidismo, somatostinoma, aldosteronoma entre otros (Kramer y col. 2010).

### **1.3 EL PÁNCREAS**

El páncreas es una glándula mixta, contiene tejido exocrino conformado por células acinares productoras de enzimas digestivas; y también presenta un tejido endocrino compuesto por las células de los islotes de Langerhans, que producen hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa. En conjunto, los islotes representan alrededor de 1% del peso de la glándula (Guyton, 2006).

El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad (West, 1994). El tejido endocrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, con mayor densidad en la zona de la cola. Estas células son: células productoras de insulina o  $\beta$ , que representan el 70%; células productoras de glucagón o  $\alpha$ , que representan el 20%; las células productoras de somatostatina o  $\delta$ , que representan entre un 5 y 10%, y las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor del 2% (Olvera-Granados, 2008).

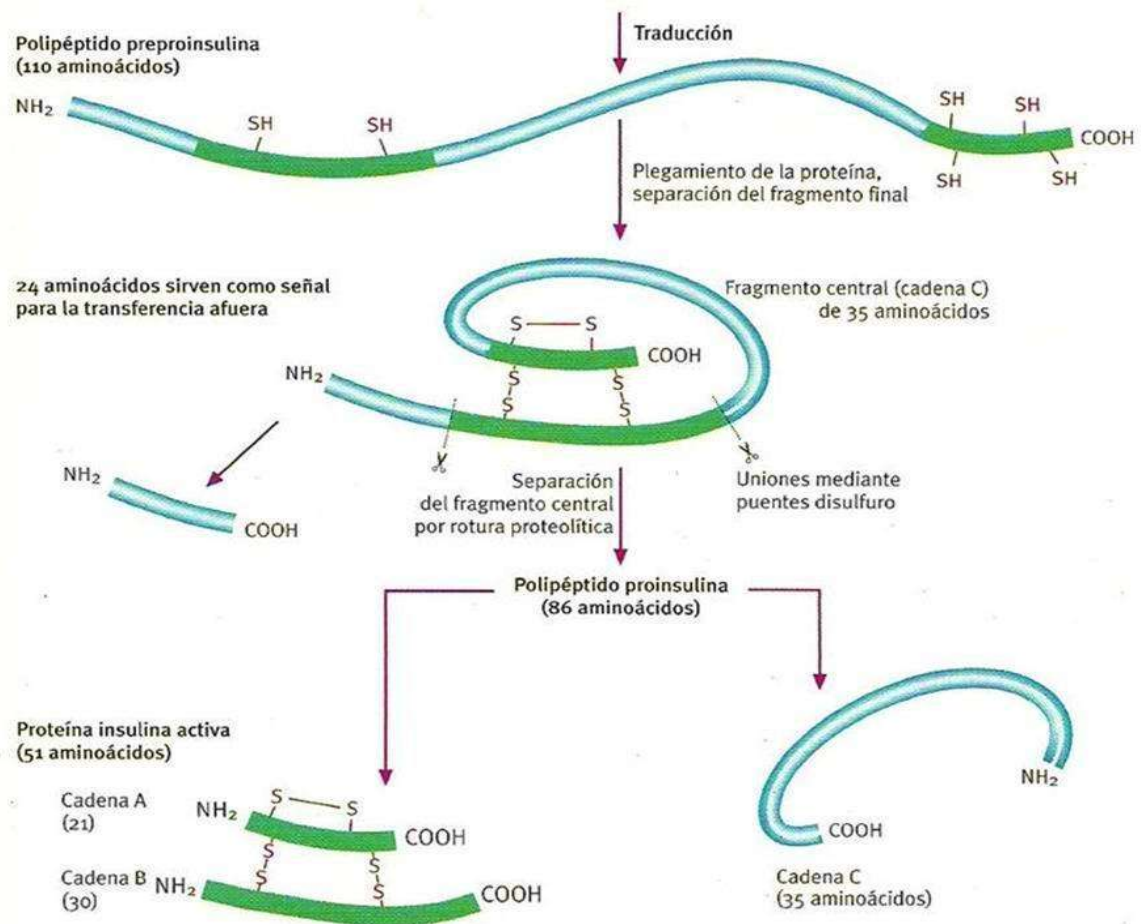
### **1.4 LA INSULINA**

La insulina es una hormona polipeptídica que se sintetiza y secreta en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas. Químicamente, la insulina es una molécula pequeña (Mendoza, 2005); posee un peso molecular de 5.8 kDa (Olivares y col., 2008), consta de dos cadenas polipeptídicas, una cadena A y una cadena B de 21 y 30 aminoácidos respectivamente. Las dos cadenas están unidas por un par de enlaces disulfuro; un enlace intracatenario conecta los aminoácidos 6 y 11 (Leu -Leu) de la cadena A y otros dos enlaces intercatenarios conectan los aminoácidos 7-7 (Cys-Cys) y 19-20 (Cys-Cys) de las cadenas A y B (Mendoza, 2005).

La insulina se sintetiza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso de las células  $\beta$  de los islotes, como preproinsulina, que contiene 109



aminoácidos. Este precursor pierde enzimáticamente algunos aminoácidos, y se transforma en proinsulina que consta de 83 aminoácidos de cadena única en espiral. La proinsulina, se transforma en insulina en el aparato de Golgi de las células  $\beta$ , por un proceso enzimático, dando lugar a la insulina y a un péptido conector o péptido C, de 32 aminoácidos, que se acumula en gránulos secretorios ligados al Golgi, en el citoplasma celular (Olivares y col., 2008).



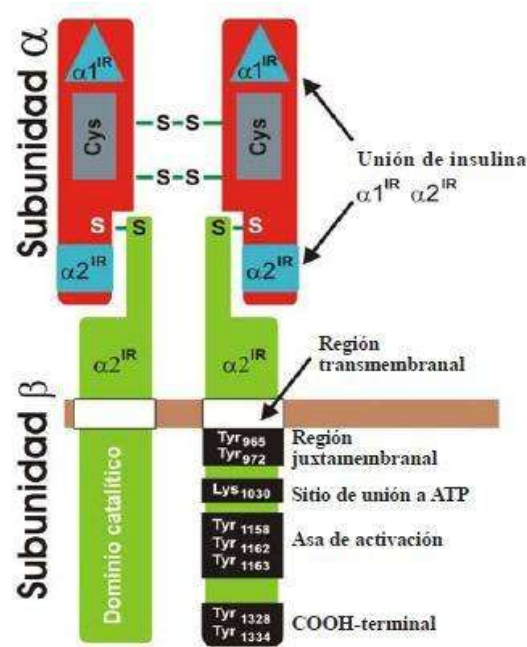
**Figura 1.** Síntesis de insulina. (Tomado de Rennenberg, 2009)

La insulina es una de las hormonas anabólicas más importantes, es necesaria para el transporte de glucosa y aminoácidos a través de las membranas

celulares, la formación de glucógeno en el músculo esquelético, la síntesis de lípidos, síntesis de ácidos nucleicos, así como para la síntesis de las proteínas (Olivares y col, 2008).

Su principal función metabólica consiste en aumentar la velocidad del transporte de la glucosa hacia el interior de las células musculares y adiposas (Cintra, 2007). La insulina también ejerce actividades típicamente asociadas con factores de crecimiento, estimula y modula la transcripción y translocación de proteínas, el crecimiento celular, síntesis de ADN, replicación celular, apoptosis, entre otros procesos (Heras-Sandoval y Arias, 2009). En las últimas décadas se han descubierto, además, sus efectos sobre funciones del sistema nervioso central: modulación del ciclo apetito-saciedad, función reproductiva, liberación de neurotransmisores, supervivencia neuronal y plasticidad sináptica (Jagua y col., 2008).

La insulina ejerce sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina (IR) es una glicoproteína que pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de tirosina (RTK's), los cuales al ser estimulados por su ligando, se autofosforilan en residuos de tirosina (Myers, 2002). Son proteínas tetrámicas, conformados por dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$  unidas entre sí por puentes disulfuro (figura 2). Los receptores poseen una región extra-citoplasmática conformada por las dos cadenas  $\alpha$  y el extremo amino terminal de las cadenas  $\beta$ . Además, posee otra región intra-citoplasmática formada exclusivamente por las cadenas  $\beta$  en la cual hay tres dominios característicos, uno de ellos es el dominio Tirosina cinasa (TK) (Mendivil, 2005).



**Figura 2.** Receptor de insulina (Olivares y col., 2008).

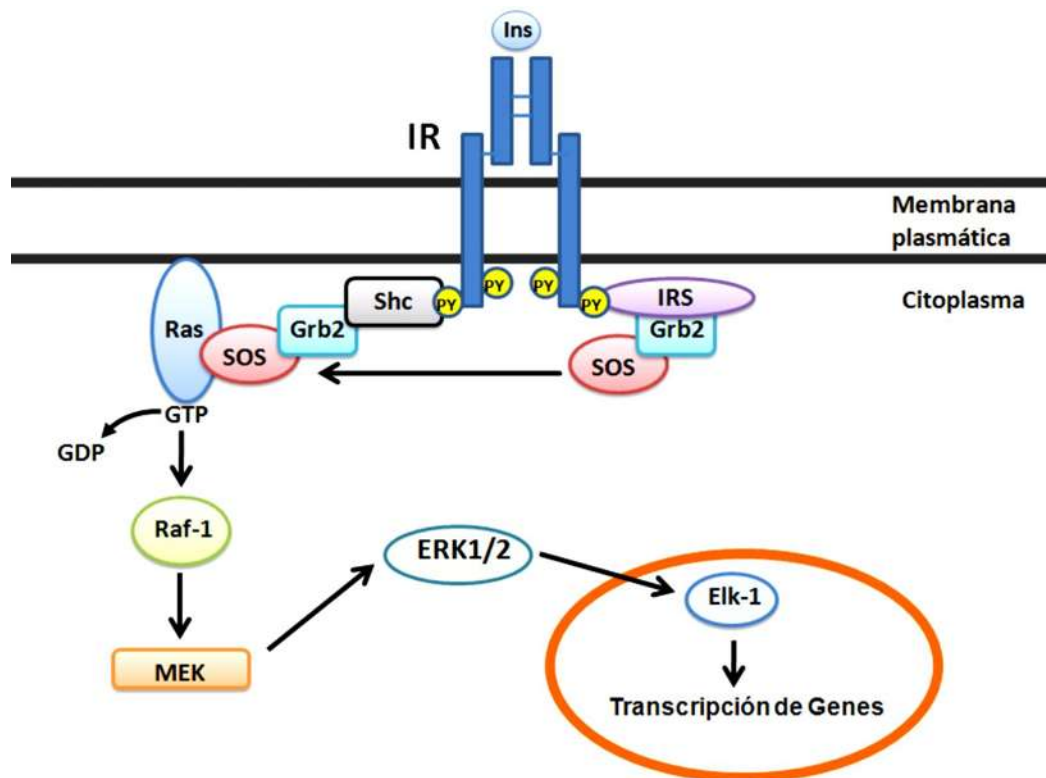
Una vez que la insulina interacciona con su receptor y éste se activa, se inicia el encendido de cascadas de señalización que dependen de un gran número de interacciones proteicas.

Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas a la regulación del metabolismo energético, de la expresión genética y de efectos mitogénicos (Saltiel y col., 2001).

#### 1.4.1 Vía de señalización de las cinasas activadas por mitógenos

Los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas son mediados principalmente a través de la activación de la vía de señalización de las MAPK (Olivares y col., 2008). La insulina activa la vía de las MAPK a través de dos mecanismos: en el primero, la activación del receptor de insulina promueve la asociación de la proteína Shc, la cual facilita la unión al complejo Grb2/SOS, el cual hace el intercambio de nucleótidos para activar a Ras. GTP-Ras une y activa

a Raf-1 que subsecuentemente lleva a la fosforilación y activación de MEK y de las cinasas ERK1/2, que a su vez desencadena la activación de genes transcripcionales. Alternativamente existe una vía independiente de Shc pero dependiente de la activación del sustrato de receptor de insulina IRS por la que la insulina es capaz de activar a las MAPK. En esta, una vez activo IRS, une al complejo Grb2/SOS y a partir de este punto la secuencia de activación de proteínas es la misma que se describió para Shc (Figura. 3)(Saltiel y col., 2001).



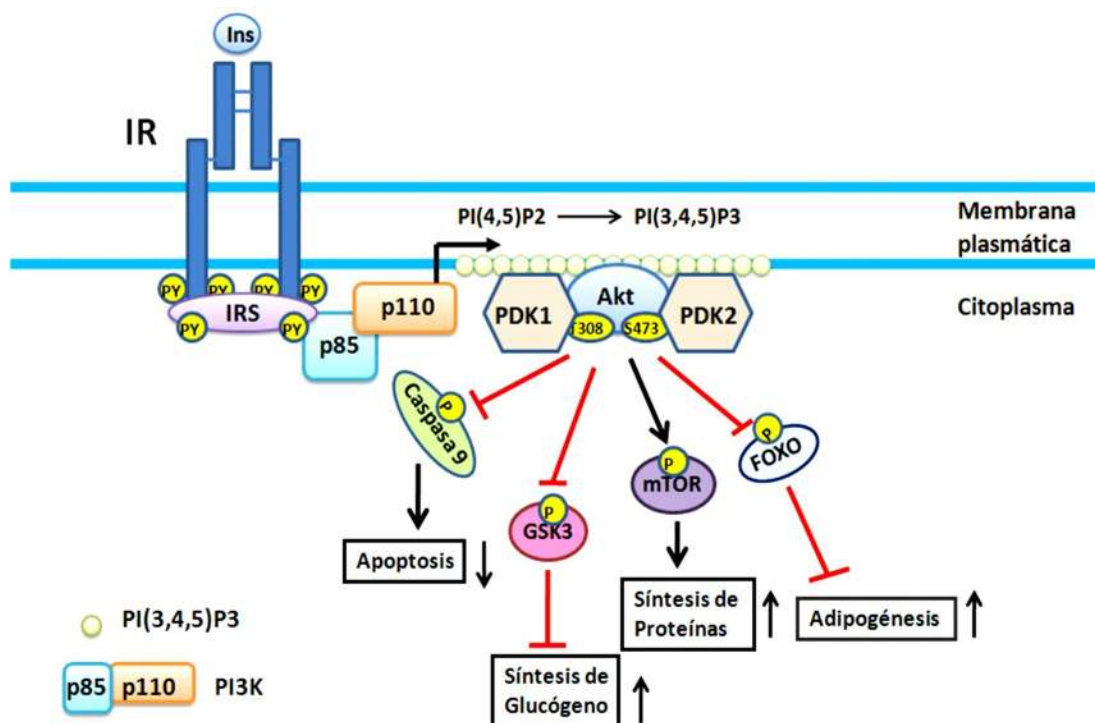
**Figura 3.** Activación de la vía de las MAPK por acción de la insulina (Olivares y col., 2008)

#### 1.4.2 Vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Olivares y col., 2008). El IR activo y autofosforilado, activa a IRS la cual contiene varios sitios de fosforilación en residuos de tirosina y que al ser fosforilados por el IR, se

convierten en sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2 como PI3K.

La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La interacción entre p85/IRS-1 activa a p110 y a consecuencia de ello, p110 tiene acceso a su sustrato PI(4,5)P<sub>2</sub>, el cual es fosforilado en la posición 3 del inositol, generando PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, que sirve como sitio de unión para cinasas de serina tales como PDK1/2 y Akt. El complejo proteico PDK2 activa a Akt. Akt regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de regular la activación de diferentes sustratos que propagan la respuesta, como mTor, FOXO, GSK3 y caspasa 9 (Figura. 4) (Virkamaki y col., 2000).



**Figura 4.** Activación de la vía de PI3K por acción de la insulina (Olivares y col., 2008)

### **1.4.3 Regulación del transporte de glucosa**

Uno de los mecanismos de acción de la insulina más estudiado es el relacionado a la regulación del transporte de glucosa en células adiposas y musculares (Olivares y col., 2008). En el músculo, la proteína IRS-1 fosforilada interactúa sobre la enzima PI3K, la cual cataliza la fosforilación del PI(4,5)2P (fosfatidil inositol 4,5 difosfato) en PIP3 (fosfatidil inositol trifosfato), el cual interactúa con la PKD1. Esta última actúa sobre PKB (proteína cinasa B) y la  $\lambda/\zeta$  PKC (proteína cinasa delta/zeta), la cuales activan de manera independiente a la proteína GAP, implicada en el transporte e integración de las vesículas GLUT-4 positivas en la membrana celular (McCarthy, 2007).

En los adipocitos, la translocación del GLUT-4 a la membrana de las células inicia con la activación de la proteína APS (proteína adaptadora que contiene dominios PH y SH2). Esta proteína actúa sobre el proto-oncogen Cbl en un proceso mediado por la proteína CAP (proteínas asociadas con Cbl), la cual se une a la Flotillina. El complejo APS/Cbl/CAP/flotillina genera una señal sobre la proteína adaptadora Crk II, que al ser desfosforilada se une con la proteína C3G y que a su vez se une a la proteína TC10, una GTPasa perteneciente a la familia Rho que cataliza la síntesis de GTP a partir de GDP, proceso que activa a la caveolina en la membrana celular. La caveolina interactúa con la actina presente en los sistemas de microtúbulos encargados del transporte de las vesículas GLUT-4 VCAMP-2 positiva hacia la membrana celular (McCarthy, 2007).

### **1.4.4 Resistencia a la insulina**

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el que las células que ordinariamente responden a la insulina dejan de hacerlo. Los individuos con resistencia a la insulina están predispuestos al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), además de asociárseles frecuentemente con un número importante de desórdenes de salud entre los que se encuentran la obesidad, la hipertensión, infección crónica y enfermedades cardiovasculares (Olivares y col., 2008).

De manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (Paz y Zick, 2002). A nivel molecular, los mecanismos por los que se genera la resistencia a la insulina pueden ser múltiples y variar de un individuo a otro. Sin embargo, la resistencia a la insulina es la consecuencia de una deficiente señalización de la insulina causada por mutaciones o modificaciones post-traduccionales del IR (Le Roith y col, 2003). En algunos casos la resistencia a la insulina se debe a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, pero más a menudo se atribuye a alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde la funcionalidad de su receptor hasta la actividad de proteínas localizadas río abajo del mismo y que desempeñan funciones importantes en la señalización de la insulina (Bhattacharya y col, 2007).

Varios agentes y condiciones metabólicas han sido implicados como inductores de la resistencia a la insulina. Los más comunes son los ácidos grasos libres y sus metabolitos; el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otras citocinas; hormonas catabólicas como la epinefrina, el glucagón y hormonas secretadas por el tejido adiposo como la resistina (Saltiel y Kahn, 2001). De esta, la resistencia a la insulina es consecuencia de la acción de diferentes inductores. Por ejemplo, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres se encuentra asociado con muchos estados de resistencia a la insulina, incluyendo obesidad y diabetes tipo 2. En humanos, el contenido y composición de triglicéridos y fosfolípidos en músculo se correlaciona directamente con la presencia de resistencia a la insulina. Inicialmente, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres, induce resistencia a la insulina por la inhibición del transporte de glucosa estimulado por la insulina, que es seguido por una reducción en la síntesis de glucógeno en músculo y la oxidación de la glucosa (Saltiel y Kahn, 2001).

Estudios a nivel molecular han determinado que el incremento en la concentración de ácidos grasos libres puede llevar a cambios en la expresión del IR y alterar, tanto la unión de la insulina con el receptor como el estado de fosforilación de su dominio de cinasa. Así mismo, pueden inhibir la activación de la enzima PI3K dependiente de IRS-1 (Le Roith y col, 2003).

## 1.5 TRATAMIENTO

El principal objetivo del tratamiento es mantener los niveles de glucosa dentro de los rangos normales. Cada tratamiento va acompañado de actividad física y una dieta baja en grasas y carbohidratos (Manual Merk, 2005).

El tratamiento para la diabetes mellitus tipo 1 es a base de insulina principalmente. Todas las presentaciones de insulinas en el mercado son prácticamente idénticas a la hormona humana y ejercen los efectos propios de esta, aunque se han realizado ligeras modificaciones en la molécula original que son responsables de las diferencias que caracterizan a cada tipo de insulina comercial (Tabla 1) (Fernández y col., 2009).

**Tabla 1.** Diferentes tipos de insulina utilizados en el tratamiento de diabetes mellitus 1.

<b>Insulina *</b>	<b>Inicio</b>	<b>Pico máximo</b>	<b>Duración efectiva</b>
Ultrarápida	5-15'	30-90'	< 5 h
Análogo acción corta (Lispro, aspártica)	0.15-0.25	1-1.5	3-4.5
Rápida (regular)	30-60'	2-3 h	5-8 h
Intermedia (NPH)	2-4 h	4-10h	10 – 16 h
Análogo acción larga (Glargina)	2-4 h	No	20 – 24 h
Análogo acción larga (Detemir)	-	-	24
Premezcla:	-	4	20-24
75% Lispro Protamina -25%Lispro	5-15'	Doble	10-16 h
50% Lispro Protamina -50%Lispro			
70% aspártica Protamina -30% aspartica			



Existen diversos grupos de medicamentos hipoglucemiantes orales con estructura química y mecanismos de acción diferentes (Fernández y col., 2009), los cuales suelen ser efectivos en la diabetes tipo 2 pero no en la diabetes tipo 1; Los hipoglucemiantes ayudan a mantener la glucosa en la sangre dentro de los niveles recomendados (SSA, 1994). Si bien, todos estos fármacos son eficientes para el control de la glucosa suelen presentar efectos adversos y contraindicaciones como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Fármacos hipoglucemiantes utilizados en el tratamiento de diabetes mellitus 2.

Hipoglucemiante	Dosis inicial	Dosis máxima	Presentación	Efectos adversos	Contraindicaciones
<b>Biguanidas</b>					
Metformina	500-850mg	2550mg	TABLETA. Cada tableta contiene: Clorhidrato de metformina 850 mg.	Efectos gastrointestinales (acidez, náuseas, sabor metálico, diarrea), acidosis láctica Interfiere en la absorción de vitamina B <sub>12</sub>	Enfermedad renal etapa 3- 4 Insuficiencia hepática Insuficiencia cardíaca severa Enfermedad pulmonar obstructiva crónica Embarazo y lactancia Alcoholismo Empleo de contrastes yodados
<b>Sulfonilureas</b>					
Glibenclámid	5mg	20mg	TABLETA. Cada tableta contiene: Glibenclámid 5 mg. Envase con 50 tabletas.	Hipoglucemia Aumento de peso Alteraciones gastrointestinales Rash/hipersensibilización Leucopenia	Diabetes mellitus 1 Hipersensibilidad Embarazo y lactancia Cetoacidosis diabética Alergia a sulfamidas
Glipizida	2.5 mg	20mg	TABLETA. Cada tableta contiene: glipizida 5 y 10 mg	Náusea, diarrea, reacciones cutáneas, mareos, somnolencia, cefalea	Hipersensibilidad droga Insuficiencia hepática Cetoacidosis diabética
Glimepirida	1 mg	4 mg	TABLETA. Cada tableta contiene: glimepirida 2 y 4 mg	Hipoglucemia Deterioro visual transitorio Reacción alérgica	Hipersensibilidad droga
<b>Glinidas</b>					
Repaglinida	0.5mg con c/ alimento	4mg con c/ alimento	COMPRIMIDO. Cada comprimido contiene: 0.5, 1 y 2 mg	Hipoglucemias Trastornos digestivos (náuseas, estreñimiento, vómito, dispepsia) No asociar repaglinida con gemfibrozilo	Diabetes mellitus tipo 1 Hipersensibilidad Cetoacidosis diabética Insuficiencia hepática grave
Nateglinida	60mg con c/ alimento	120 mg con c/ alimento	GRAGEA. Cada gragea contiene 120mg	Hipoglucemia Elevación de enzimas hepáticas Hipersensibilidad	Diabetes mellitus tipo 1 Hipersensibilidad droga Cetoacidosis diabética
<b>Tiazolidinedionas o glitazonas</b>					
Pioglitazona	15mg	30mg	TABLETA. Cada tableta contiene: Clorhidrato de pioglitazona a 15 mg de pioglitazona.	Retención de líquidos Hepatotoxicidad Edema, aumento de peso Incremento de la incidencia de insuficiencia cardíaca Aumento de fracturas de extremidades en mujeres	

## **1.6 COMPLICACIONES**

Con el paso del tiempo, la diabetes puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. La diabetes aumenta el riesgo de cardiopatía y accidente vascular cerebral (AVC), además la neuropatía de los pies combinada con la reducción del flujo sanguíneo incrementan el riesgo de úlceras de los pies, infección y, en última instancia, amputación. La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera y es la consecuencia del daño de los pequeños vasos sanguíneos de la retina que se va acumulando a lo largo del tiempo. Se estima que aproximadamente el 1% de los casos mundiales de ceguera es consecuencia de la diabetes. Por si fuera poco, la diabetes se encuentra entre las principales causas de insuficiencia renal (Sabán, 2012).

Estudios recientes han mostrado que el manejo estrecho de la diabetes disminuye o evita la presencia de complicaciones, mejorando la calidad de vida del paciente e incrementando su sobrevivencia. No obstante, el manejo estrecho de la glucosa en la diabetes tipo 2 no parece disminuir la mortalidad y sí incrementa el riesgo de hipoglucemia (Hérrnandez-Hérrnandez y col, 2008).

Los diabéticos tienen una mortalidad por enfermedad cardiovascular dos a cuatro veces mayor. La cardiopatía isquémica se presenta entre 7.5 y 20% de las personas con diabetes, mayores de 45 años de edad. De 50 a 75% de las muertes en los diabéticos son por cardiopatía isquémica. En México 7% de los pacientes con diabetes pueden tener isquemia miocárdica silente, la cual se incrementa con la edad y con el tiempo de duración de la diabetes. Dos terceras partes de los diabéticos padecen hipertensión y el riesgo de enfermedad vascular cerebral es dos a cuatro veces mayor. 15% de los diabéticos tipo 2 fallecen por un evento cerebrovascular (Escobedo y col, 2009).

Entre 60 y 70% de los diabéticos tienen formas leves o graves de daño neurológico, el cual a menudo incluye alteraciones en la sensibilidad o dolor en manos y pies, disminución del tránsito intestinal, síndrome del túnel del carpo u

otros trastornos nerviosos. Las formas graves de neuropatía son una causa contribuyente mayor de amputación de miembros inferiores. La neuropatía autonómica puede ocasionar disfunción vesical e intestinal, impotencia, y puede afectar al corazón. Más de la mitad de las amputaciones de miembros inferiores ocurren en personas con diabetes. Los diabéticos tienen cuatro a ocho veces mayor riesgo de presentar enfermedad vascular periférica. La prevalencia de esta afección se incrementa con el tiempo de duración de la diabetes (Gutiérrez y col, 2012).

La diabetes es la principal causa de insuficiencia renal crónica avanzada y contribuye con cerca de 40% de los casos nuevos. Es la principal causa de ceguera en adultos de 20 a 74 años de edad. Después de 15 años con diabetes 2% de los enfermos quedan ciegos, mientras que 10% desarrollan problemas visuales graves, secundarios a retinopatía, glaucoma y catarata. La tasa de malformaciones congénitas mayores en hijos de madres diabéticas es de 0 a 5% en aquellas mujeres con control prenatal, en comparación con 10% en aquellas sin control prenatal. La enfermedad periodontal es más frecuente y grave en los diabéticos (Villalpando y col, 2010).

La diabetes puede ocasionar eventos potencialmente fatales, como cetoacidosis diabética y coma hiperosmolar no cetósico. Los diabéticos son más susceptibles a otras enfermedades, por ejemplo, tienen mayor riesgo de fallecer por neumonía o influenza. La tuberculosis pulmonar y de otros sitios, las infecciones micóticas de piel y mucosas, la infección bacteriana de vías urinarias y las infecciones de tejidos blandos por anaerobios son problemas graves de salud en los diabéticos (Gutiérrez y col, 2012).

## **1.7 PLANTAS HIPOGLUCEMIANTES**

Cada día se presta más atención al uso de las plantas medicinales de forma que la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica están tomando un auge inesperado (Krishna y Sandhya, 2014).

La OMS ha propuesto que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos (OMS, 1999).

En nuestro país el uso de plantas medicinales constituye una tradición desde las culturas prehispánicas y se estima que cerca del 60% de la población ha recurrido al uso de alguna planta medicinal para tratar algún padecimiento (Didier, 1995)

En el tratamiento de los pacientes con diabetes, además del empleo de hipoglucemiantes orales, se puede incluir la administración de fármacos vegetales de acción hipoglucemiante, que causan pocos efectos adversos, como son malestares gastrointestinales, aumento de peso, hipoglucemias, reacciones cutáneas, mareos y náuseas. En este caso, los cambios en el tratamiento se tienen que introducir de forma lenta, controlando los valores de glucosa hasta su estabilización y siempre bajo supervisión médica (Tránsito-López, 2006).

Puesto que la diabetes causa múltiples complicaciones, puede resultar muy útil para la prevención de éstas el empleo de fármacos de origen vegetal que por su eficacia y escasa toxicidad a las dosis recomendadas, puedan utilizarse durante largos períodos (Carretero, 2005).

La información etnobotánica sugiere que alrededor de 800 plantas pueden poseer un potencial antidiabético, varias de estas plantas han mostrado actividad hipoglucemiante cuando se evaluaron utilizando diferentes tipos de técnicas experimentales (Patel y col. 2012). Se han reportado numerosos principios activos derivados de plantas que tienen acciones antioxidantes, ejercen efectos fisiológicos benéficos, incluidos el antidiabético, y pueden ser útiles como quimio-preventivos de neoplasias y enfermedades crónico-degenerativas (Figuroa, 2009), entre ellos los fenoles, flavonoides, alcaloides, glucósidos, terpenoides,

polisacáridos, péptidos, aminoácidos e iones inorgánicos han demostrado poseer actividad hipoglucemiante (Warjeet, 2011).

Los diferentes mecanismos de acción de las plantas medicinales con acción hipoglucemiante han sido ampliamente descritos. Estos incluyen la inhibición de la reabsorción renal de glucosa, la estimulación de la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas o la inhibición de los procesos de degradación de la insulina, reducción de la resistencia a la insulina, la regeneración y / o reparación de las células  $\beta$  pancreáticas con el aumento del tamaño y el número de células en los islotes de Langerhans, estimulación de la gluconeogénesis, además de la actividad antioxidante que protege a las células  $\beta$  pancreáticas contra el estrés oxidativo provocado por la diabetes (Hanhineva, 2010).

## **1.8 COMPONENTES HIPOGLUCEMIANTES EN PLANTAS MEDICINALES**

Existe evidencia de que alrededor de 800 plantas poseen potencial antidiabético, las cuales han sido probadas tanto en *in vitro* como *in vivo*, usando modelos experimentales de animales e incluso en humanos. Algunos de los distintos componentes hipoglucemiantes presentes en las plantas se describen a continuación.

### **1.8.1 Fenoles y flavonoides**

Los fenoles son un grupo grande y heterogéneo de fitoquímicos presentes en alimentos de origen vegetal, como té, café, vino, cereales, verduras, legumbres, frutas y bayas. La diversidad estructural de los fenoles se extienden desde un simple fenol como el ácido hidroxibenzoico hasta grandes macromoléculas poliméricas (Ovaskainen y col, 2008).

Un grupo esencial de los compuestos fenólicos son los flavonoides. Los flavonoides son pigmentos naturales los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, además poseen excelentes propiedades de

quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una destacada capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo (Martínez-Flórez y col, 2002).

El creciente interés en los flavonoides se debe principalmente a su amplia actividad farmacológica y a sus importantes efectos antioxidantes. Además, presentan una gran variedad de propiedades entre las que se destacan el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación como las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450. Asimismo, se ha comprobado su potente capacidad de inhibición *in vitro* de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Martínez-Flórez y col, 2002). Por otra parte, pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos de transición, catalizar el transporte de electrones, y neutralizar radicales libres. Debido a esto se han descrito efectos protectores en patologías como diabetes mellitus y sus complicaciones, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, inflamación, entre otras (Sattanathan y col., 2011).

Dada la relación entre la diabetes con el estrés oxidativo y la inflamación, y el potencial de los flavonoides para proteger el organismo contra radicales libres y otros compuestos pro-oxidativos, es posible que los flavonoides pueden reducir el riesgo de padecer diabetes o presentar alguna consecuencia derivada de dicha enfermedad dado su alto potencial antioxidante (Pickup, 2004).

Se ha evidenciado en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que estos compuestos podrían representar una alternativa terapéutica para las personas que padecen diabetes (Bailey y Day, 1989). Los diferentes mecanismos de acción de los flavonoides incluyen la inhibición de la actividad de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (Heilbronn y col., 2004), el retraso de la velocidad de vaciado gástrico y la reducción del transporte activo de glucosa a través de la membrana intestinal, la inhibición de la reabsorción renal de glucosa, la estimulación de la secreción de

insulina en las células  $\beta$  del páncreas, reducción de la resistencia a la insulina, la regeneración o reparación de las células  $\beta$  pancreáticas, estimulación de la gluconeogénesis, además de la actividad antioxidante que protege a las células  $\beta$  pancreáticas contra el estrés oxidativo provocado por la diabetes (Hanhineva, 2010).

La quercetina es uno de los flavonoides más estudiados por sus propiedades antidiabéticas (Hollman, 2005). La administración de quercetina en ratas sanas y ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina dio como resultado una marcada reducción de glucosa plasmática en animales diabéticos, mientras que el nivel de glucosa de las ratas sanas permaneció inalterado. La quercetina también provocó una reducción significativa en el nivel de colesterol y triglicéridos en plasma y aumentó su actividad de glucoquinasa hepática lo que mejoro la liberación de insulina en las ratas diabéticas (Gaikwad y col, 2014).

La quercetina puede ejercer sus efectos antidiabéticos mediante la inhibición intestinal de la digestión del almidón y producción de glucosa hepática, mejorando la captación de glucosa en el músculo, así como mediante la protección contra el daño de los islotes pancreáticos. Sin embargo, el mecanismo detallado que explica la acción antidiabética de la quercetina continua sin determinarse (Hanhineva y col, 2010).

### **1.8.2 Alcaloides**

Los alcaloides son compuestos orgánicos cíclicos que contiene nitrógeno y representan el grupo de metabolitos secundarios más numeroso. Diferentes alcaloides han sido aislados de varias plantas medicinales y se investigaron por su posible efecto antidiabético actividad en diferentes modelos animales (Mukherjee y col. 2006).

Los alcaloides ejercen una gama de actividades antidiabéticas a través de diferentes mecanismos. La berberina, un alcaloide aislado de las raíces de *B. aristata* y la tecomina un alcaloide aislado de *Tecoma stans* han mostrado actividad hipoglucemiante al ser administrados vía oral en ratas diabéticas como en seres humanos debido a la capacidad para inhibir la  $\alpha$ -glucosidasa y disminuir el transporte de glucosa en el epitelio intestinal, además de mejorar la secreción pancreática de insulina (Pan y col. 2003).

### **1.8.3 Terpenoides y esteroides**

Existen al menos 400 triterpenos conocidos, que se derivan de la vía del ácido mevalónico. Los triterpenos son precursores de esteroides en plantas y animales. Estos son compuestos activos presentes naturalmente en muchas plantas que pueden poseer potente actividad hipoglucemiante, aunque muy pocos han sido aislados y probados en modelos experimentales (Rao y Gurfinkel, 2000).

Uno de los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante de *Momordica Charantia*, es una saponina esteroidea la cual estimula la liberación de insulina y que puede ser útil en el tratamiento de la diabetes, particularmente en diabetes tipo 2 (Ng y col. 1986).

Los *ginsenósidos*, un grupo diverso de saponinas esteroides aislados del ginseng han demostrado propiedades hipoglucémicas a través de una serie de mecanismos que incluyen acciones sobre la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas y los tejidos diana que absorben glucosa. El tratamiento con ginseng en animales de laboratorio con diabetes por aloxano, aumentó la liberación de insulina del páncreas probablemente causada por el aumento de la síntesis de insulina, además de inhibir la absorción de glucosa al ser administrado vía oral (Waki y col. 1986).



#### **1.8.4 Polisacáridos**

Varias plantas como *Aloe vera* contienen polisacáridos que les confiere actividad hipoglucemiante. Los polisacáridos actúan por diversos mecanismos tales como el aumento de los niveles de insulina sérica, reducción de los niveles de glucosa en la sangre y mejora la tolerancia a la glucosa (Switi y col. 2014).

La goma obtenida de las semillas de *Cyamopsis tetragonoloba* es utilizada como antidiabética pues su viscosidad es aprovechada para retardar la tasa de absorción de glucosa y por lo tanto ayuda a reducir la hiperglucemia postprandial (Jenkins y col, 1976).

#### **1.8.5 Péptidos**

Desde los primeros estudios de la insulina reportados en animales, existen evidencias en la literatura que muestran la presencia de sustancias similares a dicha hormona en varias especies vegetales como cebolla y betabel entre otras, a la que denominaron *glucocinina* para diferenciarla de la insulina (Collip, 1923).

De igual manera, Best y Scoot (1923), reportaron sustancias parecidas a insulina en germinados de papa y arroz; ese mismo año Ellis y Eyster (1923) mostraron resultados cualitativos de la acción de insulina y glucocinina en la germinación del maíz, pero fue hasta 1970 cuando se reportó la presencia de insulina en plantas y se patentó un proceso para su obtención a partir de frutos de *Momordica charantia* (melón amargo). Los productos aislados del melón amargo se denominaron v-insulina, polipéptido-p o p-insulina, los cuales mostraron actividad hipoglucémica, pero no presentaron reacción con el anticuerpo contra insulina bovina y su composición de aminoácidos fue diferente a la hormona animal (Khanna y col., 1974).

Trabajos posteriores reportaron un péptido parecido a insulina, aislado de las semillas de *M. charantia*, empleando el mismo método de etanol ácido reportado por Best y Scoot, (1923) para extraer insulina de varios tejidos. El esquema de purificación incluía filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico, donde obtuvieron varias fracciones con propiedades similares a la insulina de animales (Wong y col., 1986).

El péptido aislado de *Momordica oleífera* el cual fue nombrado *Mo-LPI*, a diferencia del polipeptido-p, mostró reacción con anticuerpos contra la insulina, además mostró el mismo patrón de precipitación exhibido por la insulina humana recombinante después de la adición de zinc. El complejo de zinc-insulina es altamente insoluble, formando agregados que se precipitan en agua (Gualandi-Signorini y Giorgi, 2001, Paula et al. 2017). El efecto hipoglucemiante de *Mo-LPI* fue probado en ratas con diabetes por aloxano. Al realizar una curva de tolerancia a la glucosa, tras administrar una dosis de 500 mg/kg, se observó una reducción de los niveles de glucosa del 66.4% a las 5 horas. Se realizó un seguimiento a los niveles de insulina durante la administración del péptido, los cuales no aumentaron, por lo que se descartó que el mecanismo de acción fuera mediado por la liberación de insulina (Paula et al, 2017).

Rodríguez-López y colaboradores (2011) caracterizaron un factor de crecimiento en maíz, similar a la insulina, al cual denominaron ZmIGF (*Zea mays insulin-like growth factor* por sus siglas en inglés) que presentó un peso de 5.7 kDa. Los autores observaron que tejidos de maíz estimulados con ZmIGF o con insulina inducían la síntesis selectiva de las proteínas ribosomales y de ADN (Rodríguez- López y col., 2011).

Oliveira y colaboradores (1999) aislaron y purificaron una serie de proteínas a partir de la semilla de *Canavalia ensiformis*; una de estas proteínas purificadas mostro que tenía la misma secuencia de aminoácidos que los insulina de bovinos.

El análisis se repitió con diferentes muestras de la proteína obtenidos a partir de diferentes lotes de semillas y la secuenciación de aminoácidos también fue realizado por dos grupos de estudio independientes. Después de obtener un total de siete análisis para secuencia se llegó a la conclusión de que la capa de la semilla de *C. ensiformis* contenía una proteína con una secuencia igual a la de la insulina bovina (Oliveira y col., 1999).

En un estudio realizado en las hojas de *Bauhinia variegata*, se mostró la presencia de una banda proteica de un peso aproximado de 6 kDa; la posterior secuenciación de aminoácidos mostró la presencia de una proteína con identidad de secuencia parcial con la insulina bovina (Azevedo y col., 2006). El efecto del péptido parecido a la insulina aislado de hojas de *B. variegata* sobre los niveles de glucosa séricos fue demostrado en ratones hiperglucémicos a los cuales se les administro la fracción proteica de la planta vía intravenosa y se observó una disminución de los niveles de glucosa séricos similares a los obtenidos en ratones tratados con insulina bovina (Azevedo y col., 2006).

Existen reportes que sugieren la existencia en plantas de proteínas con funciones, localización y secuencia, que son similares a las proteínas de las vías de señalización características de la insulina en vertebrados, (Xavier-Filho y col. 2003). Algunas de estas proteínas encontradas en plantas son el receptor de insulina (Tirosina quinasa), sustrato de receptor de insulina 1 y 2, transportador de glucosa (GLUT-4), fosfatidilinositol 3 - cinasa, hexocinasa, entre otras (Azevedo y col., 2006).

## II.- ANTECEDENTES

Estudios realizados anteriormente por el grupo de trabajo del Laboratorio de Glicobiología de la UMSNH demostraron que el berro posee actividad hipoglucemiante (Fenton y cols., 2018).

Al realizar una curva de tolerancia a la glucosa en ratas macho hiperglucémicas de la cepa Wistar, se observó una disminución de los niveles de glucosa iniciales de un 76.6% al administrarles vía oral extracto acuoso de berro.

Al separar los componentes principales del berro en extracción acetónica (extracto acetónico) y alcohólica (extracto alcohólico), se observó que presentan una moderada actividad hipoglucemiante al realizar una curva de tolerancia a la glucosa.

Posteriormente se analizó la actividad hipoglucemiante de la fracción post-lavados (FPL); se realizó una curva de tolerancia a la glucosa administrando la fracción proteica en una dosis de 900mg/kg (igual que lo usado con el extracto acuoso de berro), obteniendo un descenso en los niveles de glucosa con resultados muy similares al descenso de glucosa observado en ratas tratadas con insulina.

### 2.1 BERRO (*Nasturtium officinale*)

El berro es una planta de 10 a 60 cm de altura, tiene tallos con raíces, son carnosos y ramificados. Las hojas alcanzan hasta 1.5cm de largo y están muy divididas; con las flores blancas o blanco violáceas. Sus frutos son vainas alargadas. Originaria de regiones boreales y australes, localizado en clima semicálido, semiseco, seco y templado entre los 1500 y los 2850 metros sobre el nivel del mar. Planta silvestre, crece frecuentemente a orillas de ríos y riachuelos y en zonas anegadas o extremadamente húmedas, asociada a bosques de encino,

de pino y mixto de pino-encino y ocasionalmente a matorral xerófilo (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En México, en los estados de Puebla, Michoacán y Tlaxcala el principal uso que se le da al berro es en el tratamiento de problemas renales. Se emplea molido o picado, con o sin raíz y se administra por vía oral cuando hay dolor de riñón. En la Ciudad de México, se refiere que los tallos y hojas, comidos en forma de ensalada, diariamente por tiempo indefinido sirven para el corazón. También se aprovecha para tratar las enfermedades del hígado, contra las afecciones de la piel, la anemia, la diabetes, en enfermedades respiratorias, y en la tuberculosis (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

### III.- JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus representa actualmente uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. En México, la diabetes representa la primera causa de muerte entre las mujeres y la segunda en los hombres, solo después de la cardiopatía isquémica, enfermedad que en muchos casos es resultante de la diabetes (Rojas-Martínez, 2015). Por sus complicaciones la diabetes puede incrementar el riesgo general de muerte prematura. Entre las posibles complicaciones están: los ataques cardíacos, los accidentes cerebrovasculares, la insuficiencia renal, la amputación de piernas, la pérdida de visión y daños neurológicos (Sabán-Ruíz, 2012).

Los tratamientos médicos para el control de la diabetes se basan generalmente en hipoglucemiantes, tales como las sulfonilureas y biguanidas (Fernandez Lorenzo, 2009), además se recomienda llevar un control de la dieta e incrementar la actividad física. Sin embargo, el uso prolongado de los hipoglucemiantes orales causa efectos secundarios como malestares estomacales, erupción cutánea o picazón y aumento de peso (Manual Merk, 2005). Además el uso de insulina inyectada, llega a generar dolor y molestias a los pacientes que la utilizan.

El difícil acceso a estos fármacos debido a su alto costo, los diferentes efectos adversos que provoca el consumo crónico de medicamentos para la diabetes, así como lo difícil que le resulta al paciente el manejo de una dieta adecuada y realizar ejercicio cotidiano, llevan a que frecuentemente el paciente abandone el tratamiento médico.

El consumo de plantas medicinales, ha ofrecido una alternativa más económica, de fácil manejo y con menos efectos adversos a las personas con diabetes (Krishna y Sandhya, 2014), es por ello que surge la necesidad de

determinar el efecto de las plantas que son utilizadas en México como hipoglucemiantes (antidiabéticas).

Se ha demostrado en modelos experimentales que de las hojas del berro (*Nasturtium officinale*) ejerce un efecto hipoglucemiante (Fenton et al., 2018), por tal motivo la obtención y caracterización del componente con actividad hipoglucemiante de esta planta es de suma importancia ya que en un futuro podría ofrecer una alternativa de fácil acceso y manejo y con menores efectos adversos a las personas que padecen diabetes.

#### **IV.- HIPÓTESIS**

El berro (*Nasturtium officinale*) contiene uno o varios principios activos con actividad hipoglucemiante en ratas con diabetes mellitus tipo I y II.

#### **V.- OBJETIVO GENERAL**

Purificar y caracterizar el o los componentes activos hipoglucemiantes del berro (*Nasturtium officinale*).

#### **VI.- OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Separar los componentes de las hojas de berro; extracto acuoso, pigmentos acetónicos, alcohólicos y fracción post-lavados.
2. Determinar el contenido de fenoles, polifenoles, flavonoides y la actividad antioxidante del extracto acuoso, pigmentos acetónicos y alcohólicos y fracción post-lavados.
3. Cuantificar el contenido de carbohidratos presentes en el extracto acuoso, pigmentos y fracción post-lavados del berro.
4. Purificar y caracterizar bioquímicamente el o los componentes activos hipoglucemiantes del berro.
5. Evaluar la actividad hipoglucemiante del o los componentes activos del berro.



## VII.- MATERIALES

- Hojas de Berro (*Nasturtium officinale*)
- Ratas macho de la cepa Wistar (a partir de 200 g)
- Reactivos grado analítico

## VIII.- MÉTODOS

### Obtención de extracto acuoso, pigmento acetónico, pigmento alcohólico y fracción post-lavados

- Obtención del extracto acuoso

Para la obtención del extracto acuoso se pesaron 30 g de hojas de berro (*Nasturtium officinale*) se homogenizaron con 30 mL de agua destilada. Después de homogenizarse, las hojas se filtraron y centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min, obteniéndose el sobrenadante, al que se llamó *extracto acuoso*.

- Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos

Se pesaron 550 g de hojas de berro a las cuales se les realizó varios lavados con acetona y posteriormente con alcohol con la finalidad de remover los pigmentos contenidos en las hojas de la planta y con ello, todos los componentes activos. Para la recuperación de los pigmentos, se realizó una destilación simple.

- Obtención de la fracción post-lavados

Después de ser removidos los pigmentos de las hojas del berro, estas se dejaron secar, se homogenizaron con PBS (0.1 M, pH 7.4), se filtraron y centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min; al sobrenadante se le llamo *fracción post-lavados* (FPL).

## **Determinación de contenido de fenoles, polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante**

- **Determinación de fenoles totales**

El ensayo de Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente (Singleton y col, 1999).

La concentración de fenoles totales en los diferentes extractos del berro (acuoso, acetónico, alcohólico y fracción post-lavados) se obtuvieron interpolando las lecturas obtenidas a 760 nm de las muestras problema en una curva patrón de ácido gálico. Las concentraciones se reportaron en mg equivalentes de ácido gálico/g extracto (mgEAG/g).

- **Determinación de polifenoles**

La determinación de polifenoles se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu. Las muestras problema (extracto acuoso, acetónico y alcohólico) se dividieron en dos partes, para evitar posibles interferencias se trató una parte de las muestras con polivinilpirrolidona (PVPP) que se une específicamente a los polifenoles en un medio ácido (Rivero, 2006).

La diferencia de las absorbancias obtenidas a 760 nm entre la parte tratada y la no tratada con PVPP de cada muestra problema refleja la concentración de polifenoles. Se utilizó una curva patrón de floroglucinol, y las concentraciones obtenidas se reportaron como mg equivalentes de floroglucinol/g extracto (mgEF/g).

- Determinación de flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó con el método de Dowd, el cual consiste en utilizar tricloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) (Ebrahimzadeh y col., 2010), el cual es capaz de formar compuestos estables con los flavonoides en metanol; estos compuestos se pueden medir espectrofotométricamente a 715 nm y de esta manera determinar la concentración de flavonoides presentes en los extractos.

Los valores de absorbancia obtenidos de las muestras problema (extracto acuoso, acetónico y alcohólico) se interpolaron en una curva patrón de quercetina. El contenido total de flavonoides se expresó en mg equivalentes de quercetina/g de extracto (mgEQ/g).

- Determinación de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó usando el 1, 1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH). El DPPH es conocido como un radical libre debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, la deslocalización del electrón intensifica el color violeta típico del radical. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Brand-Williams y col, 1995).

Se determinó la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% ( $IC_{50}$ ), utilizando diferentes concentraciones de cada extracto y midiendo espectrofotométricamente a 517 nm la reducción del DPPH. El  $IC_{50}$  se obtuvo interpolando el valor de la absorbancia en la gráfica obtenida del % de DPPH remanente contra concentración.

A su vez, fue determinado, el tiempo necesario para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50% ( $T_{EC50}$ ), utilizando una concentración

conocida del extracto y midiendo la acción del extracto sobre el radical DPPH a diferentes intervalos de tiempo. El  $T_{EC50}$  se calculó utilizando la recta obtenida del gráfico entre el % de DPPH remanente contra tiempo. Una vez obtenidos los valores de  $IC_{50}$  y  $T_{EC50}$ , se calculó la eficiencia antirradical (AE) mediante la siguiente fórmula:  $AE = 1/IC_{50} \times T_{EC50}$  (Sánchez-Moreno y col, 1997).

## **Cuantificación de carbohidratos**

- Ensayo de Benedict

Una de las reacciones más comunes en la identificación de carbohidratos es la reacción de Benedict. El reactivo de Benedict permite el reconocimiento de carbohidratos mediante reacción específica con el grupo reductor libre. El ensayo de Benedict es un método modificado de la prueba de Fehling, con la ventaja de que se utiliza un solo reactivo, lo que hace que la reacción sea más estable. El reactivo de Benedict contiene ion cúprico en medio alcalino que se reduce hasta óxido cuproso en presencia de azúcares con el hidroxilo hemiacetalico libre.

La concentración de carbohidratos se obtuvo interpolando las lecturas de la absorbancia a 430 nm de las muestras problema en una curva patrón de glucosa y se reportaron en mg/mL.

## **Determinación de la concentración de proteínas**

El método de Bradford está basado en el cambio de color del colorante azul brillante de Coomassie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del azul brillante de Coomassie G-250 de presentarse en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando el

colorante se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancias entre 465 y 595 nm (Bradford, 1977).

En el ensayo, se realizó una curva patrón utilizando BSA (Albumina Sérica Bovina 0-20 mg/mL), donde la concentración de las muestras problema se obtuvo al interpolar la absorbancia en la curva patrón.

### **Caracterización y purificación del componente activo**

Para realizar la caracterización del componente activo del berro se llevarán a cabo distintos métodos analíticos, que se describen a continuación:

- **Liofilización**

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua (u otro solvente) de una disolución mediante la congelación y posterior sublimación a presión reducida. El proceso de liofilización se realiza al vacío y a baja temperatura, de esta manera es posible evitar la desnaturalización de las proteínas (Ayala y col., 2010). Este proceso se realizó utilizando un equipo de la marca LABCONCO, con condiciones de temperatura y presión de  $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 0.200 mBar respectivamente, hasta lograr que todas las muestras quedaran completamente liofilizadas.

- **Cromatografía de exclusión molecular**

La cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas (Valcárcel, 1988).

Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados, poliacrilamida, etc. Todos estos geles (fase

estacionaria) están constituidos por gránulos de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado. Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel, aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria, en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular (Berg y col., 2007).

Para realizar la cromatografía de exclusión molecular se utilizó gel Sephadex G 75 y una columna cilíndrica de 9.5 X 1 cm. Una vez montada la columna, la muestra de FPL liofilizada se resuspendió en 500 ul de buffer 0.01 M y se hizo pasar por la columna, utilizando PBS 0.01M como buffer de elución. Se estableció con un recolector automático la recolección de fracciones de 2 ml con un intervalo de tiempo de 5 minutos.

- Electroforesis SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

La electroforesis con SDS (dodecilsulfato de sodio) es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular aparente de las subunidades de proteínas. La estructura del detergente SDS empleado en esta variación de la electroforesis en gel de poliacrilamida es  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3^- \text{Na}^+$ . El anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína máximo de 1,4 g/g). El SDS desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el

interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos) (Berg y col., 2007). El SDS-PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas y se compara con un patrón.

La electroforesis se realizó utilizando un gel de agarosa al 12% con una corriente de 100 y 150 V para cada fase. Se utilizaron marcadores moleculares (ColorBurst marca Sigma) que van desde los 8 a 210 kDa, durante un intervalo de tiempo suficiente para separar los componentes macromoleculares (Laemmli UK, 1970). Las bandas resultantes en el gel se tiñeron con azul brillante Coomassie (que permite detectar concentraciones en  $\mu\text{g}$ ) además se realizó una tinción con plata (por su sensibilidad en ng).

Finalmente, para comprobar el grado de pureza de la preparación y determinar el peso molecular aparente de las proteínas problema, se midió primero el Rf (movilidad electroforética relativa) de los marcadores moleculares; según la distancia de migración y la longitud de corrida total del gel, posteriormente se graficó con el logaritmo de su peso molecular y se interpoló el Rf de las proteínas presentes en la muestra problema obteniéndose así el peso molecular aparente.

### **Evaluación de la actividad hipoglucemiante**

- Modelo animal

Ratas macho de la cepa Wistar a partir de 200 g. de peso.

Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

Los procedimientos experimentales se realizan de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la

producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (publicación NIH no. 80-23, 1996).

- Inducción de la diabetes tipo 1

Los animales se mantuvieron en ayuno de 12 horas previas a la inducción, posteriormente se realizó la administración de aloxano (Sigma St. Louis Mo., USA) a una dosis de 200mg/Kg peso corporal en solución salina. Una hora después de la administración de la inyección de aloxano los animales tuvieron libre acceso a comida y agua.

Los animales se consideraron diabéticos, si sus niveles de glucosa sanguínea (evaluada con un glucómetro ACCU-CHEC) se encontraban por arriba de 180 mg/dL a las 48h posteriores a la administración de aloxano.

Una vez establecida la diabetes tipo 1, los animales fueron tratados con una dosis de insulina *Lantus* de 4 UI/kg de peso.

- Inducción de la diabetes tipo 2

La rata alimentada con fructosa es un modelo animal que muestra numerosas características de síndrome metabólico, entre las que destacan resistencia a la insulina, hiperinsulinemia así como hiperglucemia (Dupas y col., 2016).

La inducción de diabetes tipo 2 se realizó en ratas macho Wistar a partir de los 100 g de peso, con administración *ad libitum* de fructosa al 60%.

Los animales se consideraron diabéticos, si sus niveles de glucosa sanguínea se encontraban por arriba de 100 mg/dL a las 4 semanas posteriores a la administración de fructosa.



## **Diseño experimental**

Tanto para el modelo de diabetes tipo 1 como diabetes tipo 2, los animales se dividieron en 6 grupos de 6 animales cada uno como se muestra a continuación:

1. **Grupo I:** sanos + componente activo
2. **Grupo II:** sanos + FPL
3. **Grupo III:** diabéticos + solución salina
4. **Grupo IV:** diabéticas + insulina (diabetes tipo 1) o diabéticas + metformina (diabetes tipo 2)
5. **Grupo V:** diabéticas + componente activo
6. **Grupo VI:** diabéticas + FPL

## **Curva de tolerancia a la glucosa**

Las propiedades hipoglucemiantes de la fracción post-lavados del berro y de los componentes activos se evaluaron mediante una curva de tolerancia a la glucosa la cual es una prueba que nos orienta en la forma en que el cuerpo está metabolizando la glucosa.

Los animales se mantuvieron en ayuno de 12 horas previas a la prueba en el caso de diabetes tipo 1, y 4 horas para el modelo de diabetes tipo 2, transcurrido este tiempo se realiza una lectura de la glucosa basal (tiempo 0), se les administró el tratamiento propuesto y media hora después se les administró una carga oral de glucosa, posteriormente se realizó la medición de la glucemia a los 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos.

## **Análisis estadístico**

Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA) para saber si existen diferencias significativas en los grupos de estudio. En caso de obtener una  $P \leq 0.05$  se realizó un análisis post-hoc Tukey para determinar entre cuales grupos hay diferencias.

## IX. RESULTADOS

Una vez que fueron obtenidos los extractos acuosos, acetónicos, alcohólicos y la fracción post-lavados (FPL), se inició con la cuantificación de metabolitos presentes en los distintos extractos del berro.

### Determinación de fenoles totales

Los niveles de fenoles totales en el extracto acuoso, acetónico, alcohólico y FPL se muestran en la tabla 3, donde se puede observar que, por lo menos, todos los extractos contienen fenoles en cantidades significativas, sin embargo, el extracto alcohólico del berro es el que presenta una mayor concentración.

**Tabla 3.** Contenido de fenoles totales en extractos de berro.

EXTRACTO	FENOLES mg EAG/g extracto
Acuoso	61.47±8.47a
Acetónico	112±9.45 b
Alcohólico	552.5±39.12 c
FPL	144.03±4.13 b

Los datos representan la media  $\pm$  DE (n=6 de ensayos). Las letras minúsculas en la columna indican diferencia significativa ( $P \leq 0,001$ ). mg EAG/g extracto.- miligramos equivalentes de Ácido gálico/ gramo de extracto.

### Determinación de polifenoles

En la tabla 4 se muestran los resultados de polifenoles obtenidos de cada extracto del berro. Se puede apreciar que el extracto alcohólico es el extracto donde se cuantificó la mayor concentración de polifenoles, mientras que en la FPL no se encontraron.

**Tabla 4.** Contenido de polifenoles en extractos de berro.

<b>EXTRACTO</b>	<b>POLIFENOLES mgEF/g extracto</b>
Acuoso	568.5±50.13 a
Acetónico	812.75±6.70 b
Alcohólico	1680.25±127.37 c
FPL	No contiene

Los datos representan la media ± DE de n=6 de ensayos. Las letras minúsculas en la columna indican diferencia significativa (P≤0,001). mg EF/g extracto.- miligramos equivalentes de floroglucinol/ gramo de extracto.

#### **Determinación de flavonoides**

Los valores obtenidos de la cuantificación de flavonoides de cada uno de los extractos del berro se muestran en la tabla 5, aunque todos los extractos tuvieron niveles de flavonoides significativos, el extracto alcohólico fue el que presento una concentración mayor de estos.

**Tabla 5.** Contenido flavonoides en extractos de berro.

<b>EXTRACTO</b>	<b>FLAVONOIDES mg EQ/g extracto</b>
Acuoso	773±64.38 a
Acetónico	1400±207 b
Alcohólico	5067±116.83 c
FPL	42.86±0.5 d

Los datos representan la media ± DE (ensayos n=6). Las letras minúsculas en la columna indican diferencia significativa (P≤0,001). mg EQ/g extracto.- miligramos equivalentes de quercetina/ gramo de extracto.

### Determinación de actividad antioxidante.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad antioxidante de cada uno de los extractos. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de IC<sub>50</sub> y T<sub>EC50</sub>, Una vez obtenidos los valores de IC<sub>50</sub> y TEC<sub>50</sub>, se calculó la Eficiencia Antirradical (EA). Además, se muestran también los valores obtenidos de los controles de ácido ascórbico y ácido gálico.

**Tabla 6.** Actividad antioxidante en extractos de berro.

<b>EXTRACTO</b>	<b>IC<sub>50</sub></b> (g Antioxidante/kg DPPH)	<b>T<sub>EC50</sub></b> (min)	<b>EA x 10<sup>-3</sup></b>
Ácido ascorbico	78.14±4.5	1.375 ± 0.25	9.30
Ácido gálico	31.64±0.18	14 ± 1.12	2.25
Acuoso	4.04±0.14	9.8 ± 4.98	25.2 a
Acetónico	79.31±0.43	40.5 ± 0.02	0.31 b
Alcohólico	89.6±0.035	52.1 ± 2.88	0.21 b
FPL	9.2±0.19	64.8±1.35	1.6 c

Los datos representan la media ± DE (ensayos n=6). Las letras minúsculas en la columna indican diferencia significativa (P≤0,001). IC<sub>50</sub>.- cantidad necesaria de antioxidante para reducir en un 50 % la concentración inicial de DPPH; T<sub>EC50</sub>.- tiempo necesario para reducir en un 50 % la concentración inicial de DPPH; AE.- Eficiencia antirradical.

Los datos en la tabla 6 muestran que todos los extractos del berro poseen actividad antioxidante. De acuerdo a la clasificación de Sánchez-Moreno (1998) para la eficiencia antirradical (EA <1x10<sup>-3</sup> baja; EA 1x10<sup>-3</sup> – 5x10<sup>-3</sup> media; EA 5x10<sup>-3</sup> – 10x10<sup>-3</sup> alta; EA > 10x10<sup>-3</sup> muy alta), el extracto acuoso posee una EA muy alta, mientras que los extractos acetónicos y alcohólicos presentan EA baja y FPL una EA media.

## Cuantificación de carbohidratos

Los valores obtenidos de la cuantificación de carbohidratos de cada extracto del berro se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Contenido de carbohidratos en extractos de berro.

<b>EXTRACTO</b>	<b>CARBOHIDRATOS</b> mg/mL
Acuoso	7.08±0.020 a
Acetónico	10.55±0.058 b
Alcohólico	3.10±0.044 c
FPL	0.35±0.023 d

Los datos representan la media ± DE (n=6 ensayos). Las letras minúsculas en la columna indican diferencia significativa ( $P \leq 0,001$ ).

En la tabla 7 se observa que todos los extractos del berro contienen carbohidratos, sin embargo, el extracto acetónico presentó una concentración mayor, mientras que en la FPL se obtuvo una concentración muy reducida de estos.

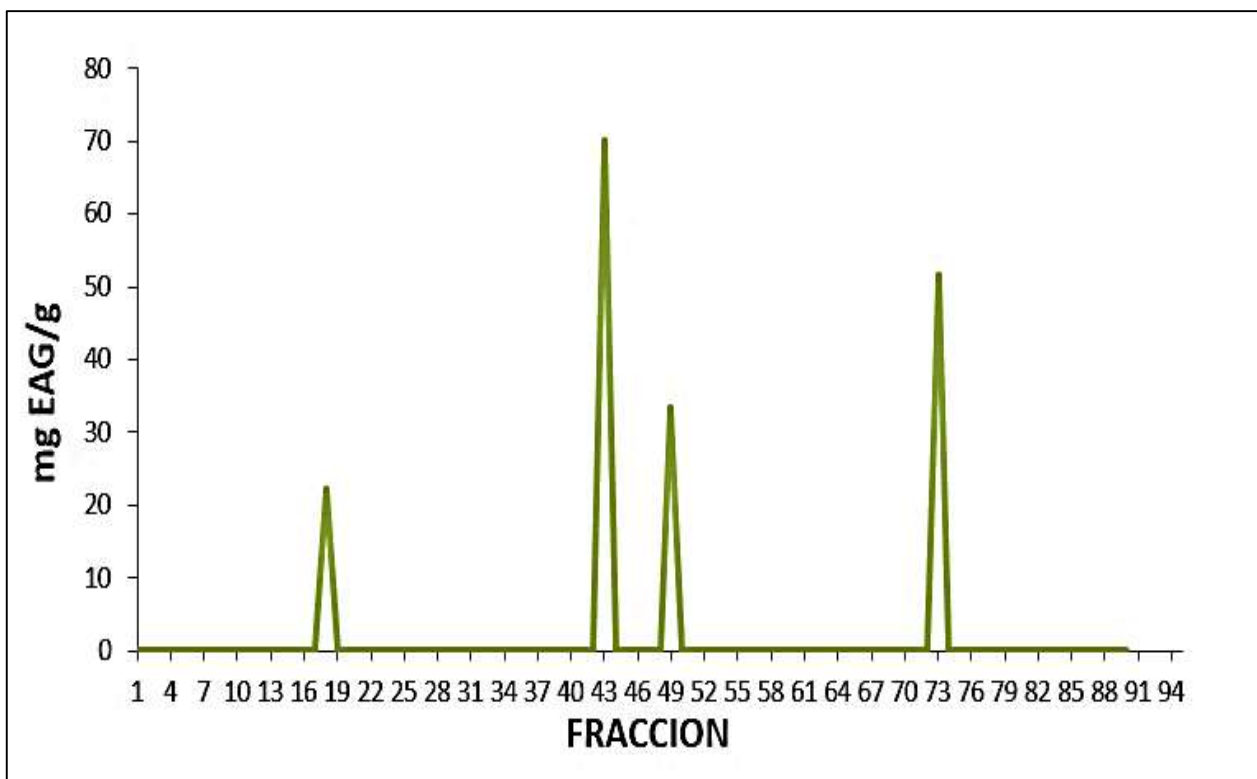
## CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL COMPONENTE ACTIVO HIPOGLUCEMIANTE DEL BERRO

### Cromatografía de exclusión molecular

Para iniciar con la caracterización del o los componentes activos del berro, se realizó una cromatografía de exclusión molecular con la finalidad de poder separar los diferentes compuestos presentes en la fracción post-lavados (FPL), ya que esta fracción es la que presenta mayor actividad hipoglucemiante.

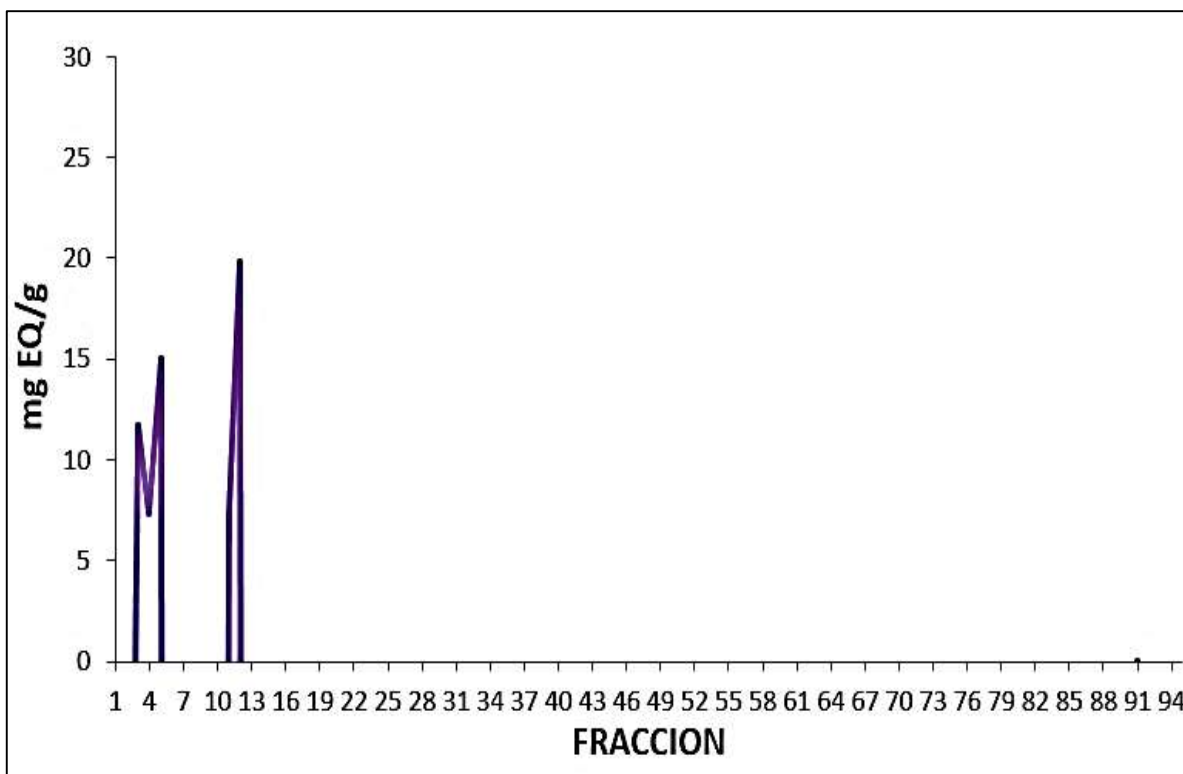
Para realizar la cromatografía de exclusión molecular se estableció el flujo de recolección de fracciones a 2 ml con un intervalo de tiempo de 5 minutos.

En la figura 5, se muestra el cromatograma de elución representativo de los fenoles presentes en la FPL, daba la gran variedad de estos compuestos se observa como eluyen en diferentes picos.



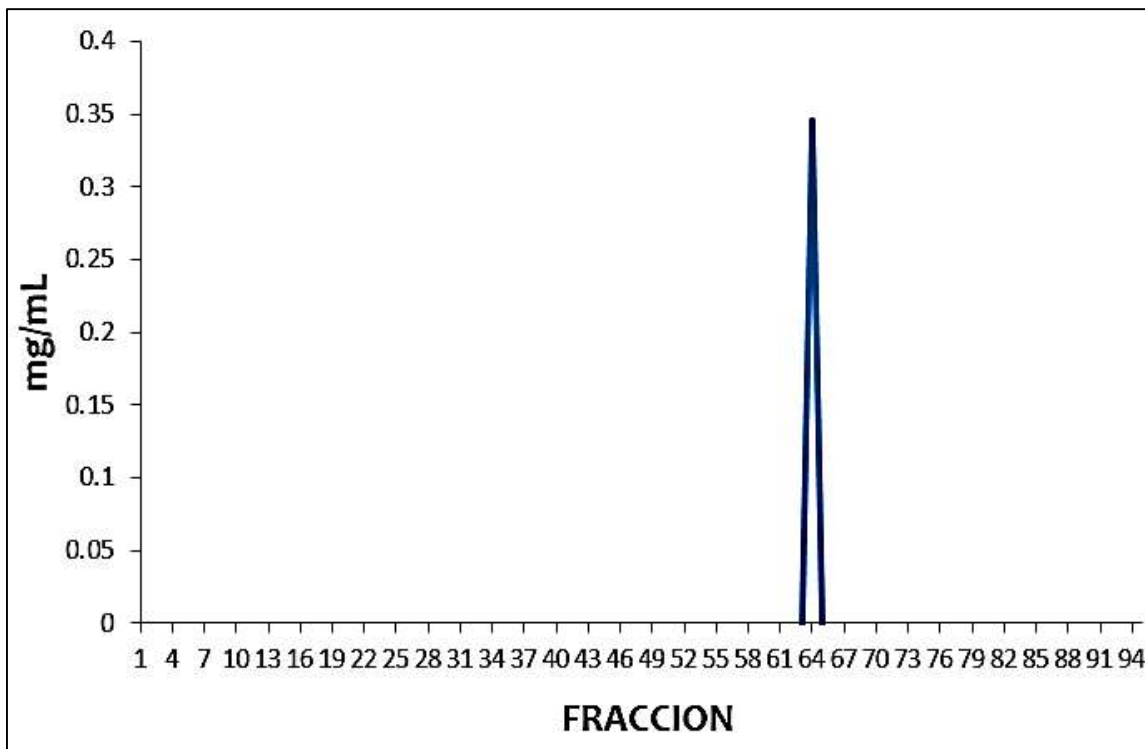
**Figura 5.** Cromatograma representativo de los fenoles cuantificados en la FPL. mgEAG/g.- miligramos equivalentes de ácido gálico/ gramo de extracto

En la figura 6, se muestra el cromatograma representativo de los flavonoides presentes en la FPL del berro, ya que estos compuestos poseen un gran tamaño, se puede observar como eluyen en las primeras fracciones de la cromatografía.



**Figura 6.** Cromatograma representativo de los flavonoides cuantificados en la FPL. mgEQ/g.- miligramos equivalentes de quercetina/ gramo de extracto

En la figura 7, se muestra el cromatograma representativo de los carbohidratos presentes en la FPL del berro. Se puede observar como los carbohidratos se agruparon en un solo pico.



**Figura 7.** Cromatograma representativo de los carbohidratos cuantificados en la FPL.



En la tabla 8 podemos observar los valores que se cuantificaron de cada uno de los compuestos presentes en la FPL y en que fracción se logró separar cada uno. Además, se puede apreciar como las concentraciones obtenidas de los diferentes compuestos, corresponden a los que fueron determinados antes de realizar la cromatografía en los diferentes extractos del berro (tablas 3, 4, 5, 7).

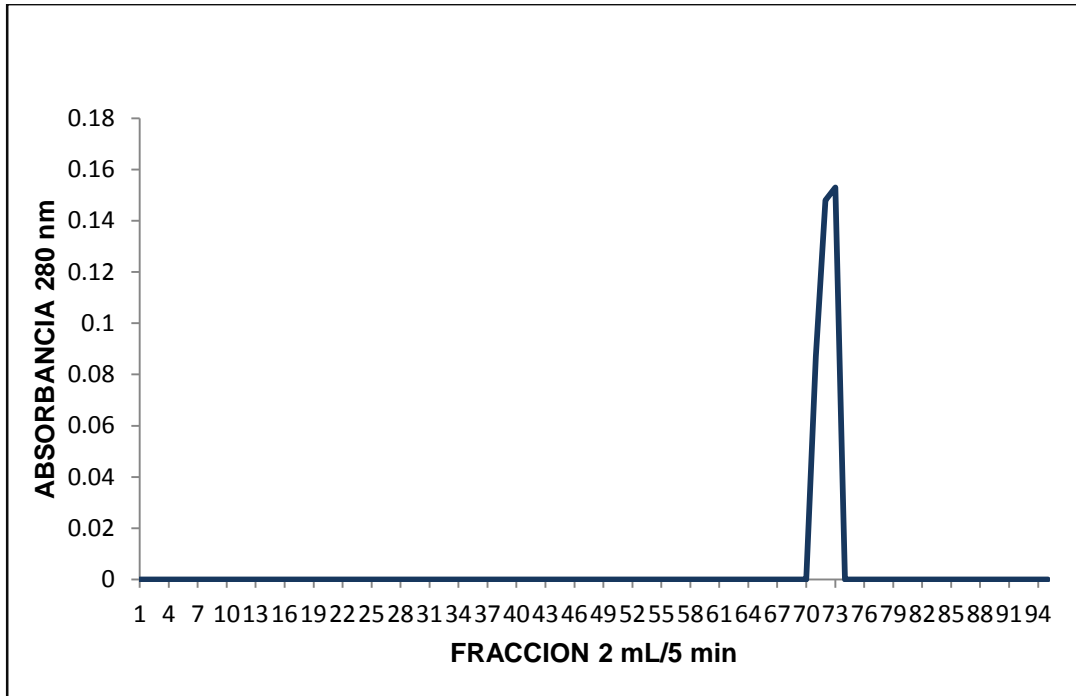
**Tabla 8.** Concentración de los distintos compuestos presentes en la FPL del berro.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	FRACCIONES
Fenoles	168.6 mgEAG/g	18,43,49,73
Polifenoles	No contiene	N/A
Flavonoides	46.4 mgEQ/g	3,5,12
Carbohidratos	0.346 mg/mL	64

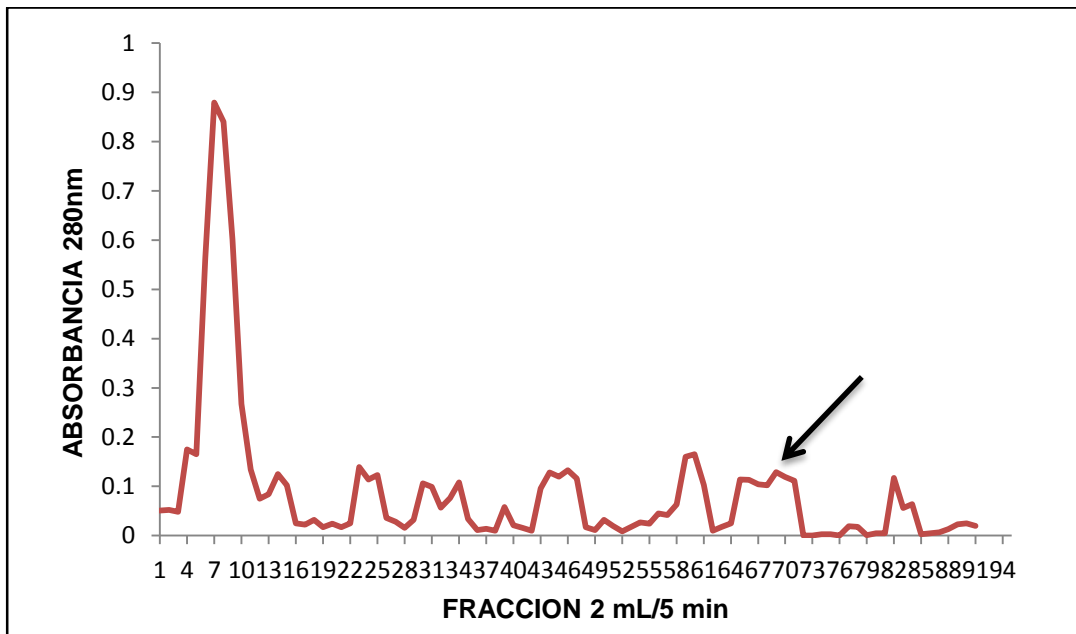
mgEAG/ g.- miligramos equivalentes de ácido gálico/gramo de extracto  
 mgEQ/g.- miligramos equivalentes de quercetina/gramo de extracto  
 N/A-no aplica

Se realizó una lectura a 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular para saber si la FPL contenía proteínas y en que fracciones se encontraban. Además, se realizó una cromatografía utilizando insulina para conocer el patrón de elución de la hormona y poderlo comparar con el de la FPL.

En la figura 8 se observa el cromatograma representativo de la insulina, donde se aprecia que esta eluye en un solo pico en las fracciones de la 70 a la 73, mientras que en la figura 9 se muestra el cromatograma representativo de las proteínas presentes en la FPL, donde se puede observar que, aunque presenta un patrón muy diferente al de la insulina, se observan picos de proteínas que coinciden con el pico de esta.



**Figura 8.** Patrón de elución de la insulina.

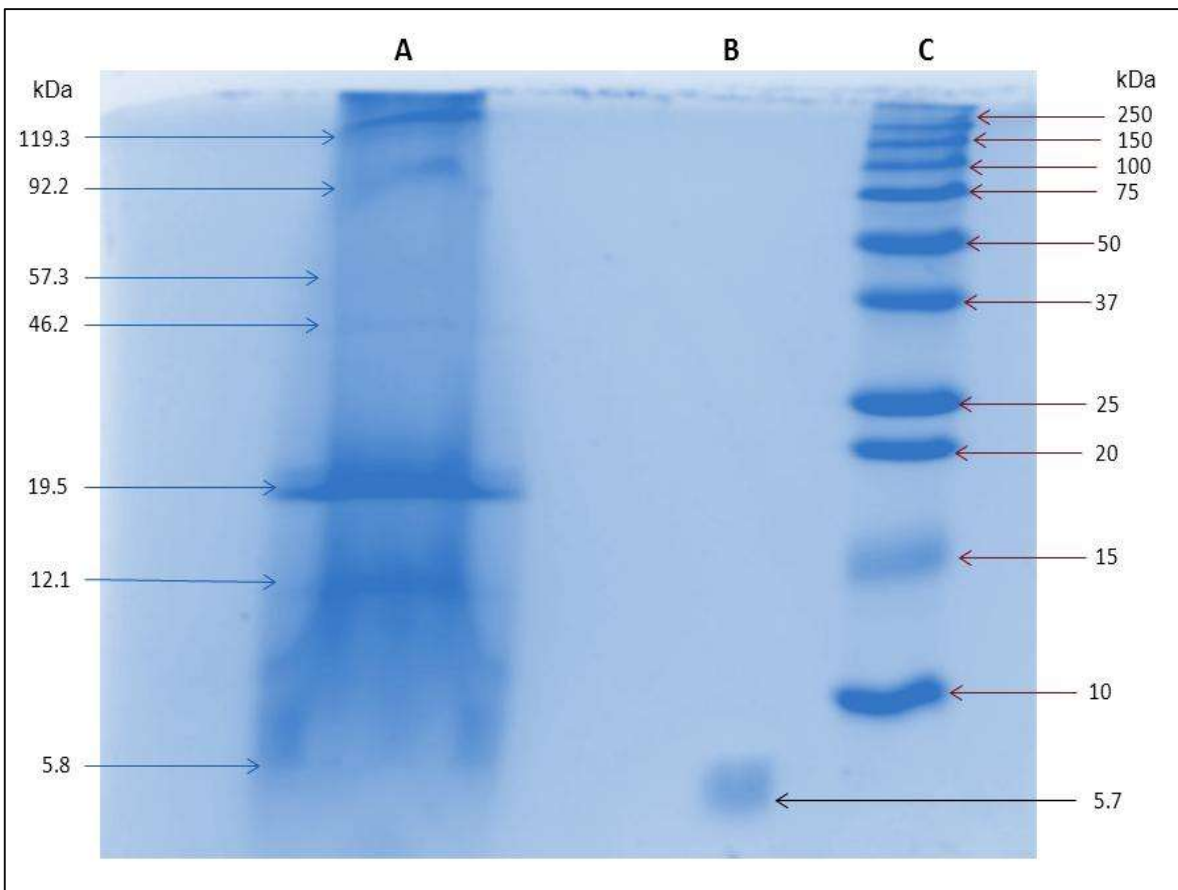


**Figura 9.** Cromatograma representativo de las proteínas presentes en la FPL. La flecha indica el pico que coincide con el pico de insulina.

## Electroforesis SDS-PAGE

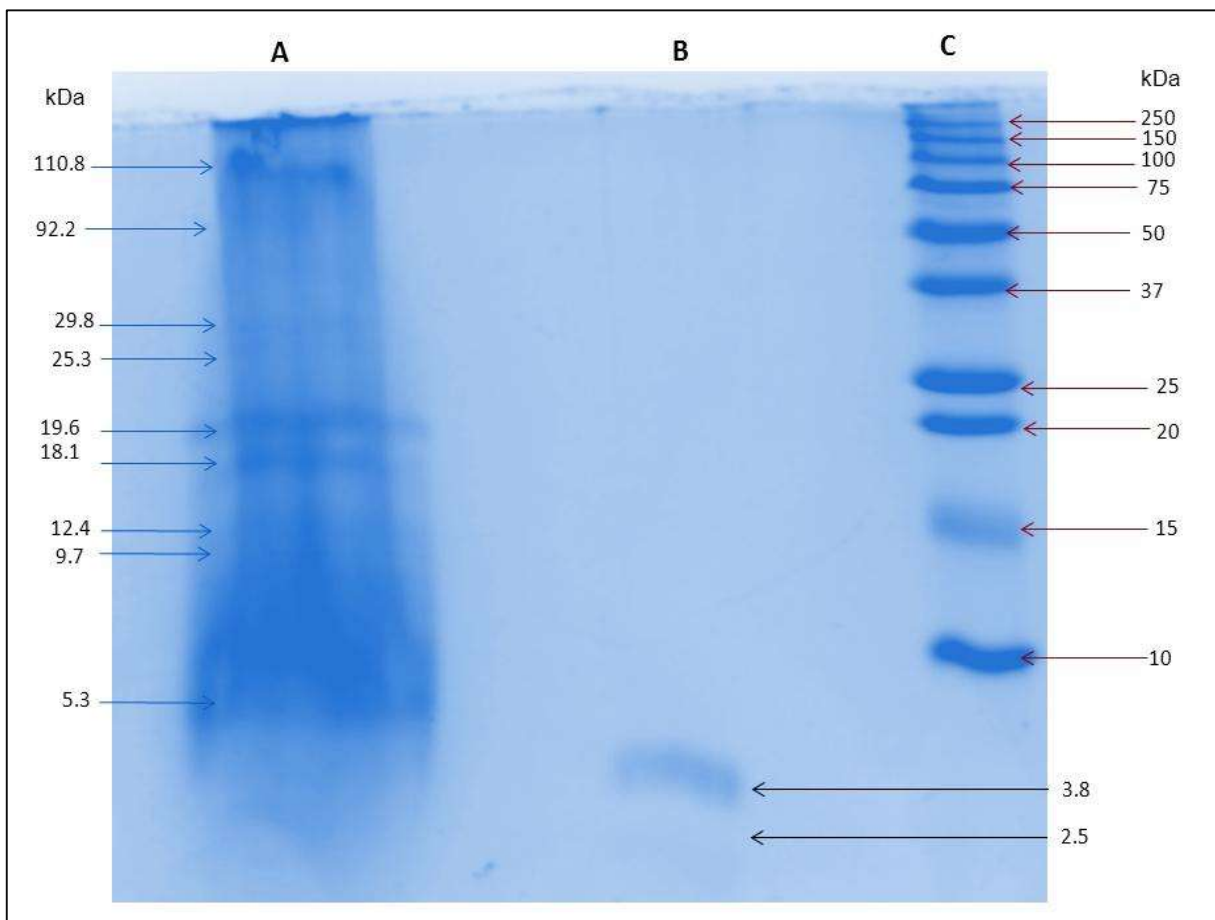
Para observar la heterogeneidad de la muestra así como para obtener el peso molecular aparente de las proteínas presentes en la FPL del berro se realizó una electroforesis SDS-PAGE.

En la figura 10 se observa el patrón de bandas obtenido en condiciones no reductoras, en el carril de la FPL se aprecia siete proteínas con pesos moleculares aparentes de 119.3, 92.2, 57.3, 46.2, 19.5, 12.1 y 5.8 kDa respectivamente, además se observa como la insulina presenta una sola banda con un peso molecular aparente de 5.7 kDa.

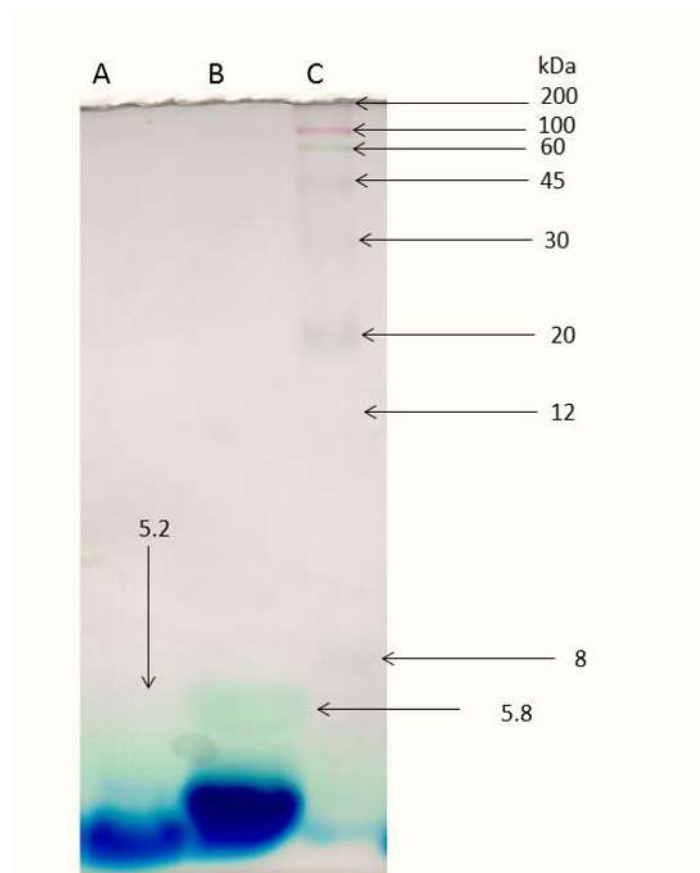


**Figura 10.** Electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras. **A.-** FPL; **B.-** Insulina; **C.-** Marcador de peso molecular. Las flechas indican el peso molecular aparente de cada banda dada en kDa.

En la figura 11 se observa el patrón obtenido bajo condiciones reductoras; se puede observar como en estas condiciones aparecen nueve bandas en lugar de siete en el carril de la FPL con pesos moleculares aparentes de 110.8, 92.2, 29.8, 25.3, 19.6, 18.1, 12.4, 9.7 y 5.3 kDa respectivamente, lo que sugiere que por lo menos dos proteínas presentaban puentes disulfuro en su estructura, sin embargo la proteína con peso molecular aparente similar al de la insulina se presentó en una sola banda. En el carril de la insulina se observan dos banda con pesos moleculares aparentes de 3.8 y 2.5 kDa respectivamente.



En la figura 12 se observa el gel que se realizó en condiciones no reductoras de la proteína obtenida del berro y utilizando como control a la insulina, de las que se obtuvo un peso molecular aparente de 5.2 y 5.8 kDa respectivamente. Se puede observar como el peso molecular aparente de esta fracción es muy similar al peso molecular de la insulina



**Figura 12.** Electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras. **A.-** Proteína berro; **B.-** Insulina; **C.-** Marcador de peso molecular. Las flechas indican el peso molecular aparente de cada banda dada en kDa.

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Posterior al análisis de componentes hipoglucemiantes presentes en la FPL del berro, se procedió a evaluar la actividad hipoglucemiante de cada uno de ellos; para realizar dicha evaluación, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa en los modelos animales de diabetes tipo 1 y 2.

El primer componente hipoglucemiante a probar fue los *fenoles*. La tabla 9 muestra cómo fueron divididos los animales, el componente control utilizado así como la dosis utilizada y la vía de administración empleada para evaluar el efecto hipoglucemiante de los fenoles de la FPL. La dosis administrada de componente control corresponde a lo que fue previamente cuantificado en la FPL del berro (tabla 3).

**Tabla 9.** Grupos experimentales curva tolerancia a la glucosa con fenoles en diabetes tipo 1 y 2.

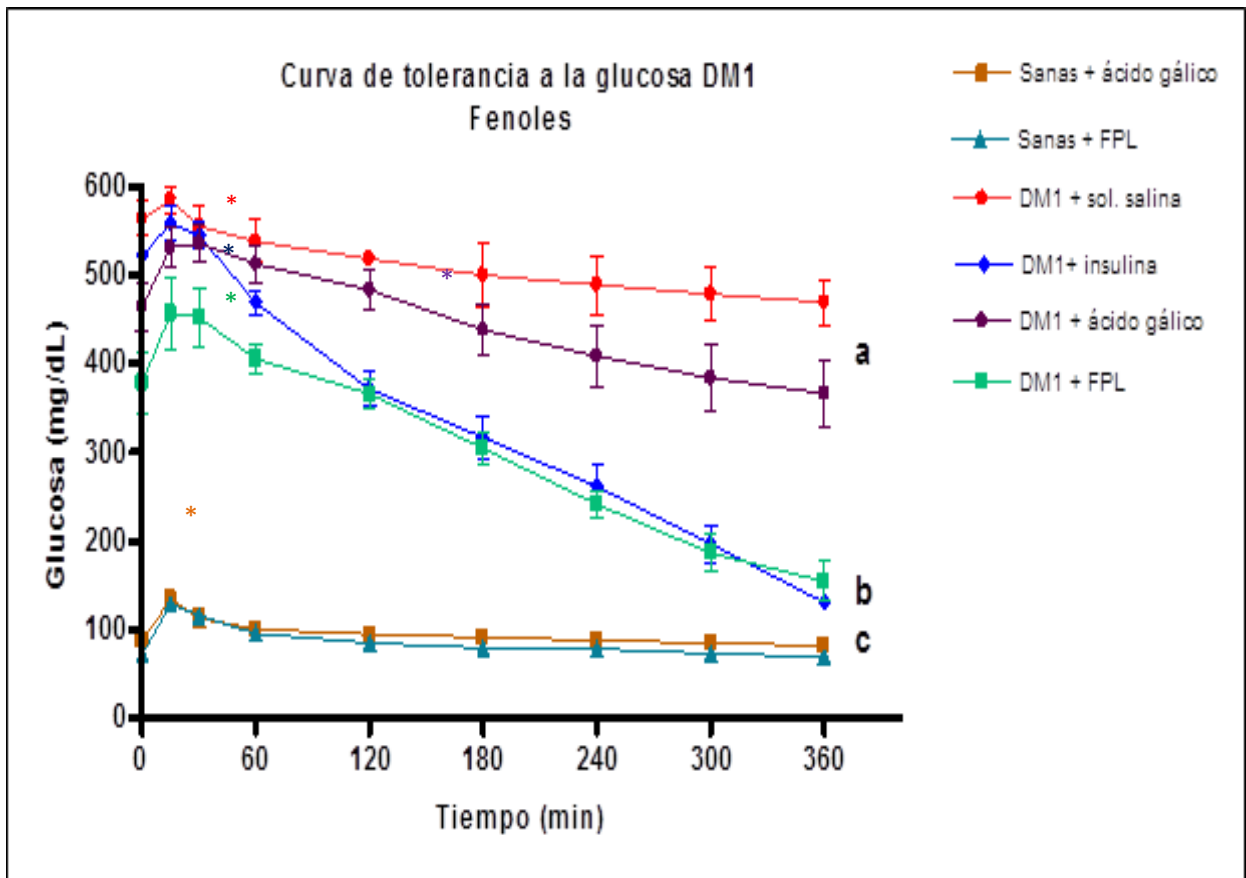
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Control sanos + Acido gálico	Control sanas + FPL	Control diabéticas + Solución salina	Grupo diabéticas + insulina o metformina*	Grupo diabéticas + ácido gálico	Grupo diabéticas + FPL
144.03 mg/ kg	900 mg/ kg	0.9%	4UI/kg 100mg/ kg	144.03 mg/ kg	900 mg/ kg
Vía oral	Vía oral	Vía oral	Vía intradérmica/ Vía oral	Vía oral	Vía oral

\*Para Diabetes 1: insulina, Diabetes 2: metformina

En las figuras 13 a y 13 b se esquematizan los ensayos realizados con fenoles y en el modelo experimental de diabetes tipo 1. En estas gráficas se observa como la reducción de la concentración de glucosa en el grupo de ratas sanas tratadas con la FPL y el componente control (ácido gálico) se normaliza a los 30 minutos después de la carga de glucosa y se mantiene dentro de estos valores normales durante todo el ensayo. El grupo de ratas tratadas con solución salina muestran niveles elevados de glucemias durante todo el ensayo, a comparación de las ratas tratadas con insulina que disminuyen en un 75% sus niveles iniciales de glucosa, mostrando una reducción significativa a partir de los 60 minutos.

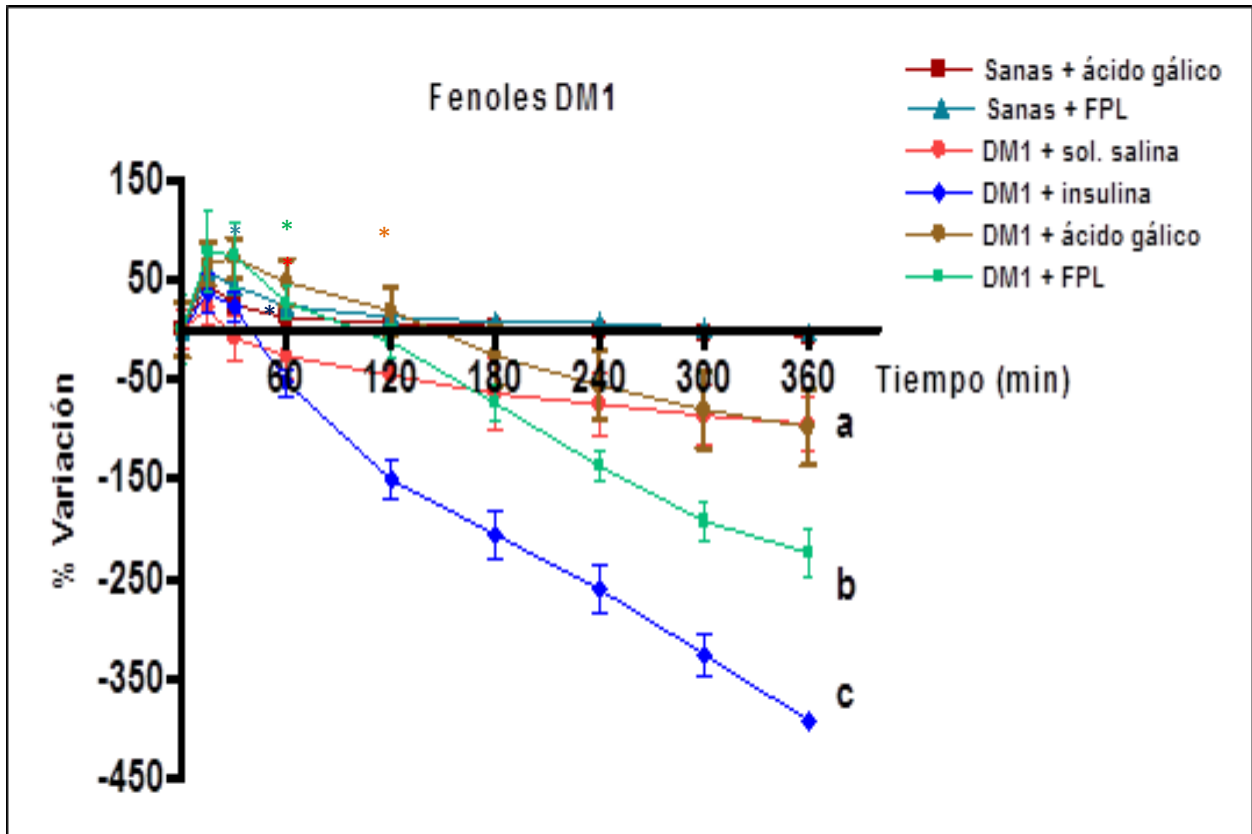
Al comparar el comportamiento de los fenoles presentes en la FPL y el ácido gálico, se observa que tienen un porcentaje de reducción muy distinto, ya que mientras el ácido gálico redujo solamente un 30% y muestra una reducción de glucosa significativa hasta los 180 minutos, la FPL muestra una reducción del 69% comenzando a normalizar los valores de glucosa a los 60 minutos, de manera similar a la insulina.

Al analizar estos datos estadísticamente, se muestra que entre la FPL y la insulina no existe una diferencia significativa ( $P \geq 0.001$ ), pero entre la FPL y el ácido gálico y el ácido gálico e insulina si existen diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.001$ ).



**Figura 13a.** Curva de tolerancia a la glucosa con Fenoles en diabetes tipo 1. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.





**Figura 13b.** Normalización de datos de curva de tolerancia a la glucosa con Fenoles en diabetes tipo 1. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.

La tabla 10 muestra los valores de porcentaje de reducción de la glucosa inicial de cada uno de los compuestos probados así como el área bajo la curva.

**Tabla 10.** Porcentaje de reducción y área bajo la curva de curva de tolerancia a la glucosa con fenoles en diabetes tipo 1.

<b>COMPONENTE</b>	<b>% REDUCCIÓN</b>	<b>ÁREA BAJO LA CURVA</b>
<b>Solución salina</b>	9% a	100%
<b>Insulina</b>	75% b	25%
<b>Acido gálico</b>	30% c	70%
<b>FPL</b>	69% b	31%

Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ).

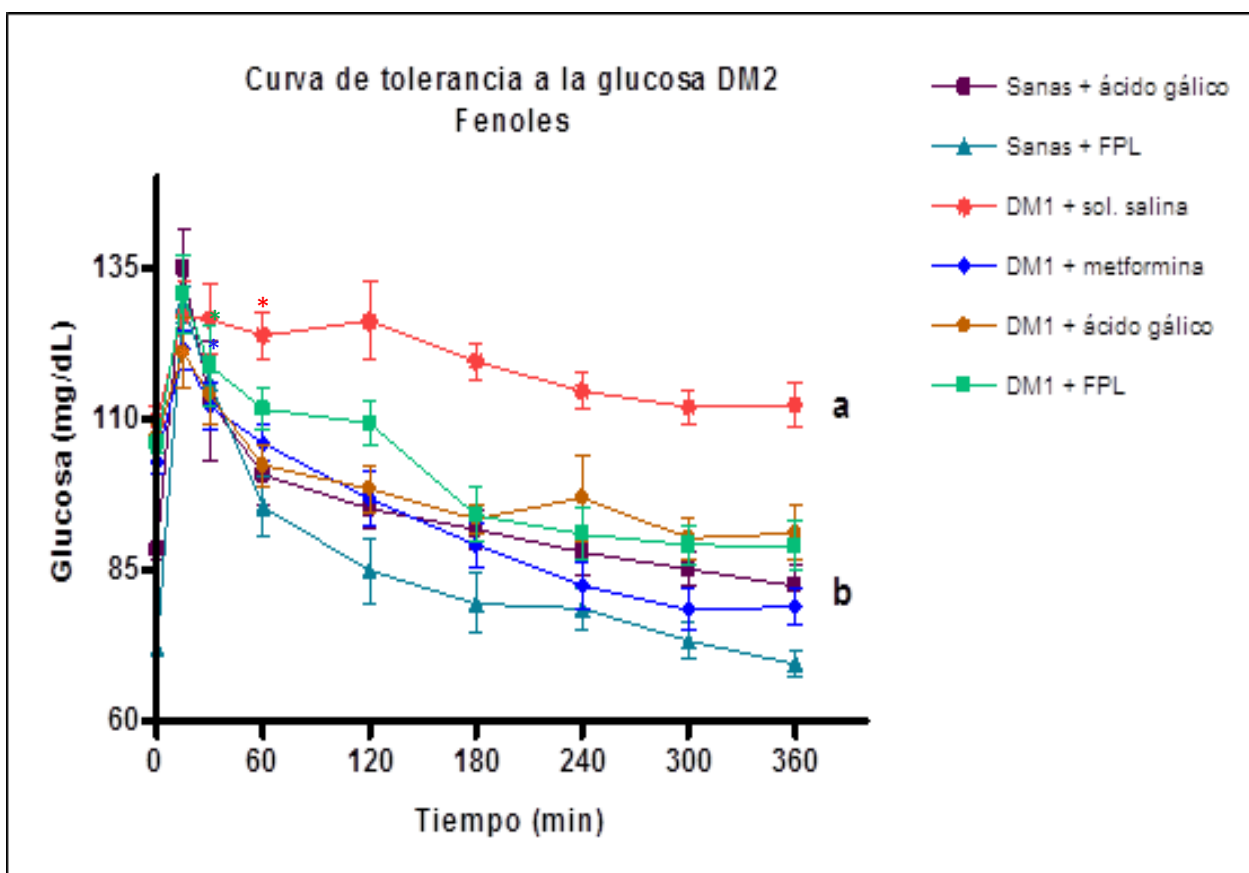
En las figuras 14a y 14b, se observa el ensayo realizado en el modelo de DM2 con fenoles, En estas gráficas se puede observar nuevamente como aquellos grupos de ratas sanas tratadas con la FPL y ácido gálico se normalizan rápidamente después de la carga de glucosa y se mantienen dentro de estos valores durante todo el ensayo.

Los grupos de ratas tratadas con solución salina muestran una nula reducción de la glucosa ya que después de la carga de glucosa, no logran en ningún momento descender los niveles de glucosa, mientras que, las ratas diabéticas tratadas con metformina muestran una reducción de los niveles de glucosa a partir de los 30 minutos con una reducción total del 23% logrando descender a niveles normales de glucosa.

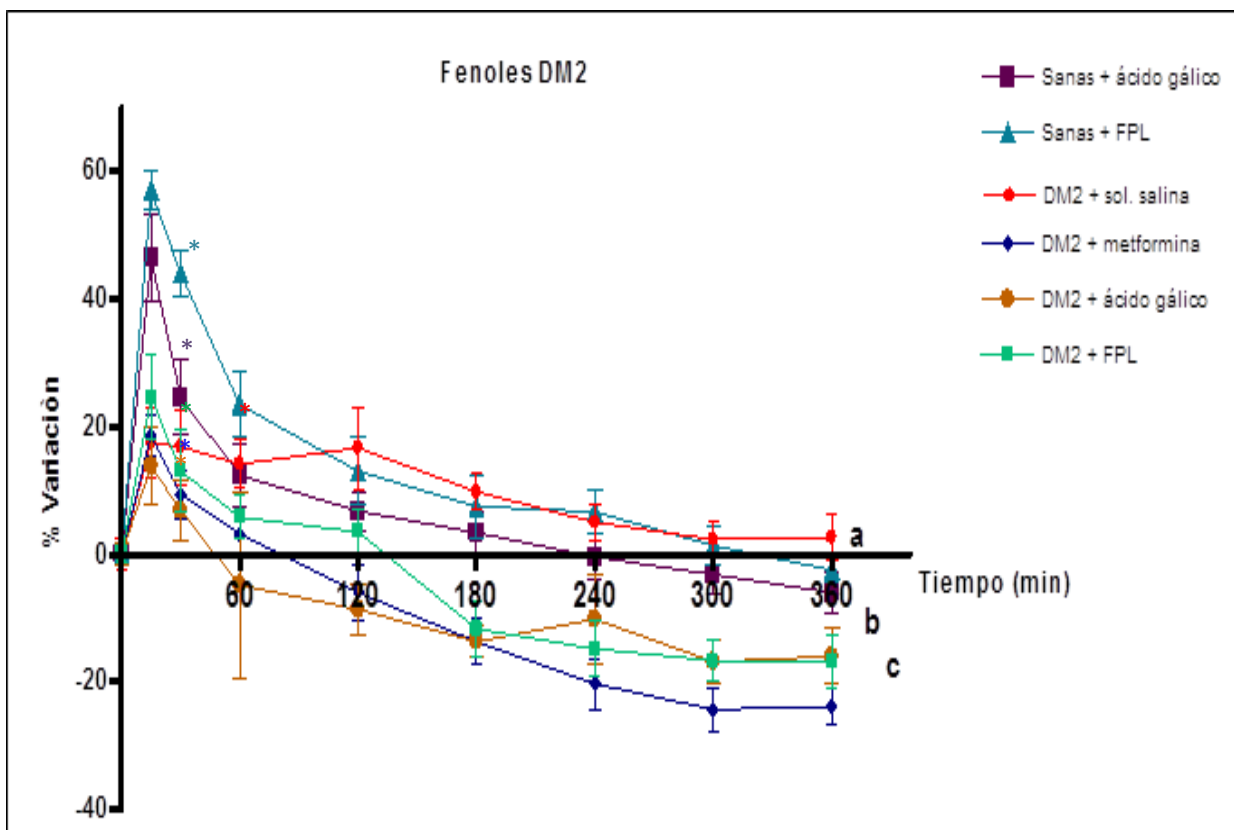
Al analizar el comportamiento de los fenoles presentes en la FPL y el ácido gálico, se aprecia una reducción en los niveles de glucosa muy similar entre los grupos. Entre la FPL, el ácido gálico y la metformina no se presentan diferencias estadísticamente significativas ( $P \geq 0.001$ ), ya que sus porcentajes de reducción

fueron de 16%, 15%, y 23% respectivamente, donde la reducción de los niveles de glucosa se observa en los tres grupos a partir de los 30 minutos.

La tabla 11 muestra los valores de porcentaje de reducción de la glucosa inicial de cada uno de los compuestos probados así como el área bajo la curva.



**Figura 14a.** Curva de tolerancia a la glucosa con Fenoles en diabetes tipo 2. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.



**Figura 14b.** Normalización de datos de curva de tolerancia a la glucosa con Fenoles en diabetes tipo 2. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.

**Tabla 11.** Porcentaje de reducción y área bajo la curva de curva de tolerancia a la glucosa con fenoles en diabetes tipo 2.

COMPONENTE	% REDUCCION	AREA BAJO LA CURVA
Solución salina	0% a	100%
Metformina	23% b	77%
Acido gálico	15% b	85%
FPL	16% b	84%

Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ).

Para evaluar la capacidad hipoglucemiante de los flavonoides presentes en la FPL del berro, se dividieron a los animales en 6 grupos de 6 ratas cada uno y tratados con los componentes y dosis como se muestra en la tabla 12. De igual forma que en la evaluación de efecto hipoglucemiante de fenoles, la dosis administrada de componente control corresponde a lo que fue previamente cuantificado en la FPL del berro (tabla 5).

**Tabla 12.** Grupo experimentales curva tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 1 y 2.

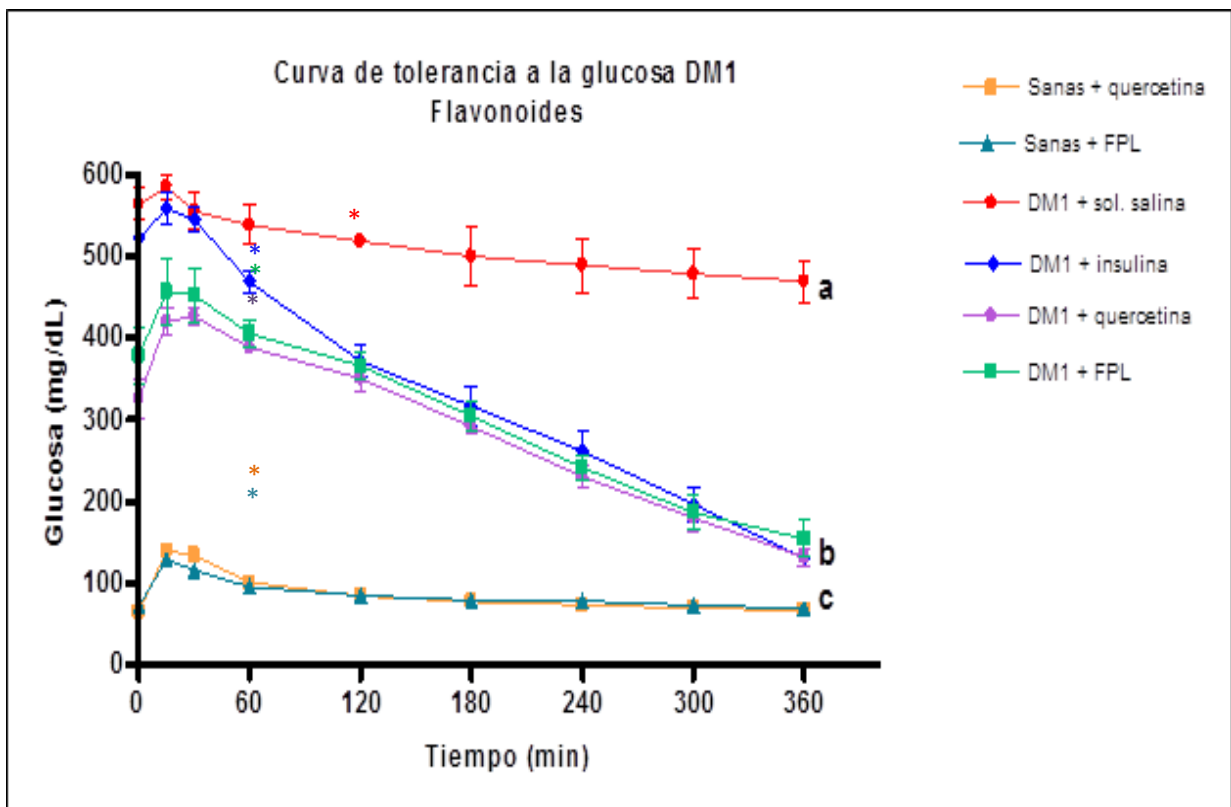
<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Grupo IV</b>	<b>Grupo V</b>	<b>Grupo VI</b>
Control sanos + quercetina	Control sanas + FPL	Control diabéticas + Solución salina	Grupo diabéticas + insulina/ Metformina*	Grupo diabéticas + quercetina	Grupo diabéticas + FPL
42.86 mg/ kg	900 mg/ kg	0.9%	4UI/kg 100mg/ kg	42.86 mg/ kg	900 mg/ kg
Vía oral	Vía oral	Vía oral	Vía intradérmica/ Vía oral	Vía oral	Vía oral

\*Para Diabetes 1: insulina, Diabetes 2: metformina

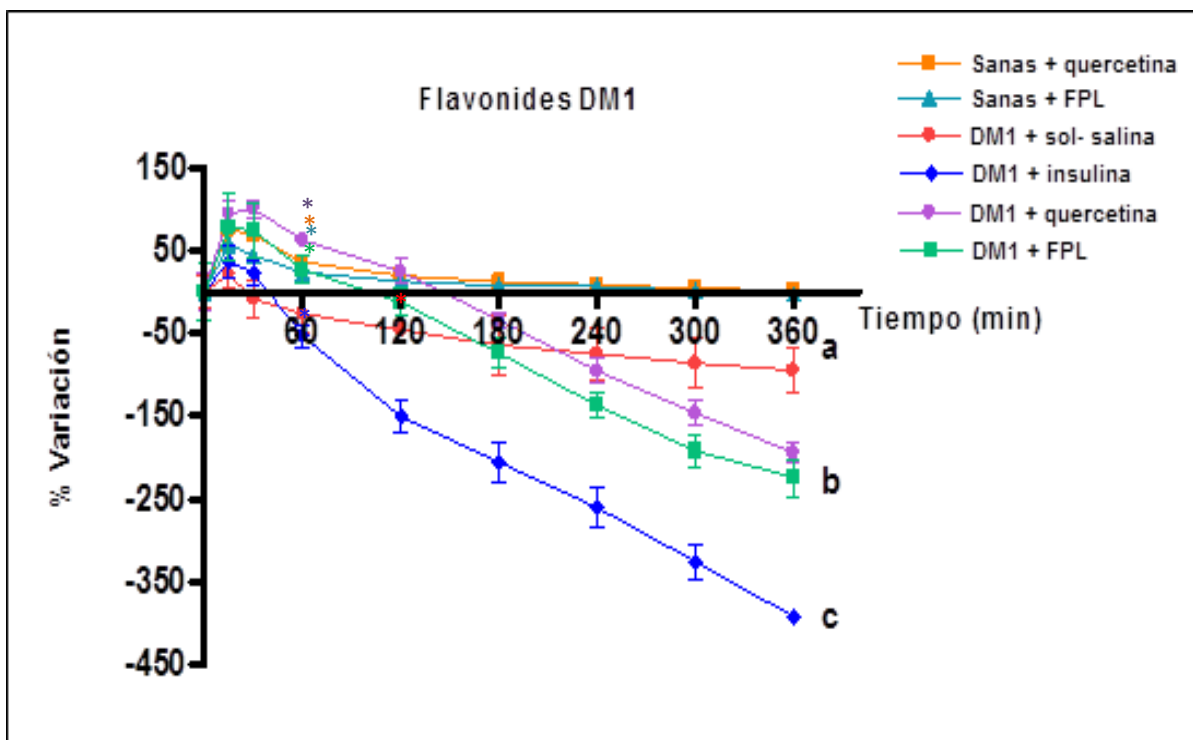
En las figuras 15a y 15b se esquematizan el ensayo realizado con flavonoides en el modelo experimental de diabetes tipo 1. En estas gráficas se observa como la reducción de la concentración de glucosa en el grupo de ratas sanas tratadas con la FPL y el componente control (quercetina) comienza a normalizarse a partir de los 30 minutos después de la carga de glucosa y se mantiene dentro de estos valores normales durante todo el ensayo. El grupo de ratas tratadas con solución salina muestran una reducción casi nula de la glucosa, manteniéndose en niveles elevados durante todo el ensayo, a comparación de la

reducción ejercida por la insulina que es del 75% y que empieza a normalizar los valores de glucosa a partir de los 60 minutos.

El grupo tratado con el componente control, quercetina, mostro una reducción de glucosa del 60%, donde a los 60 minutos se empezaba a evidenciarla reducción en los valores de glucosa. Los grupos tratados con insulina, quercetina y FPL no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $P \geq 0.001$ ) ni en sus porcentajes de reducción de glucosa ni en el tiempo en el que comenzaron a efectuar el efecto hipoglucemiante.



**Figura 15a.** Curva de tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 1. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.



**Figura 15b.** Normalización de datos de curva de tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 1. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.

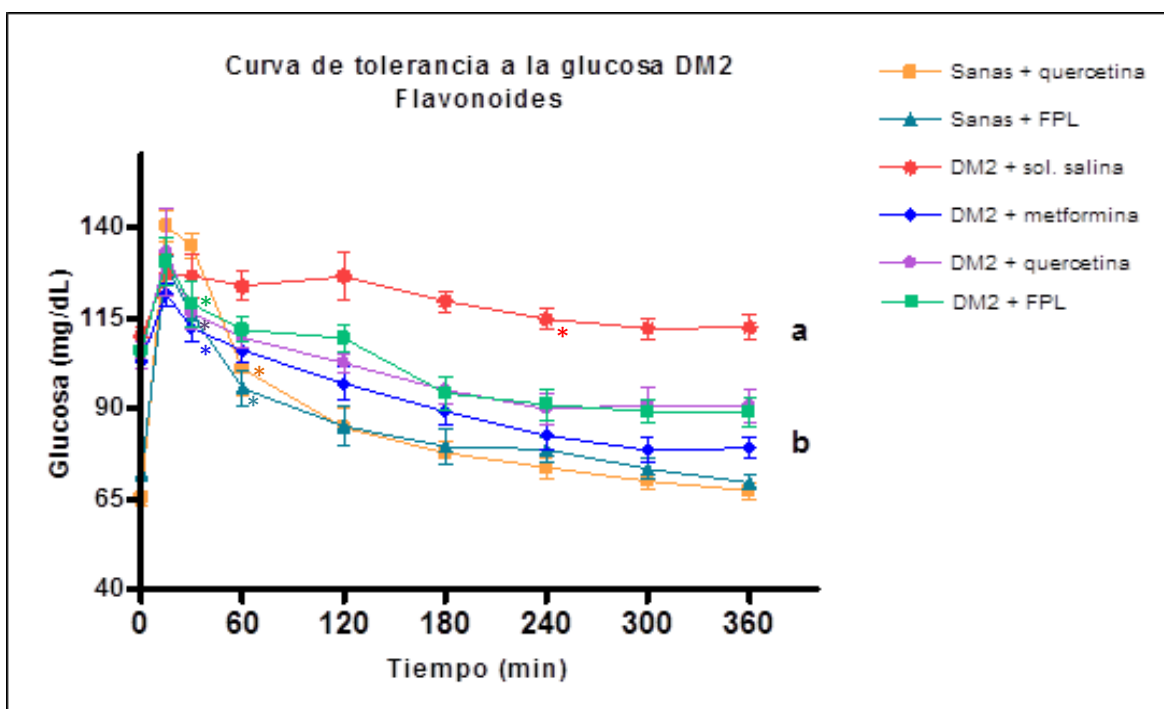
**Tabla 13.** Porcentaje de reducción y área bajo la curva de curva de tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 1.

COMPONENTE	% REDUCCION	AREA BAJO LA CURVA
Solución salina	9% a	81%
Insulina	75% b	25%
Quercetina	60% b	40%
FPL	69% b	31%

Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ).

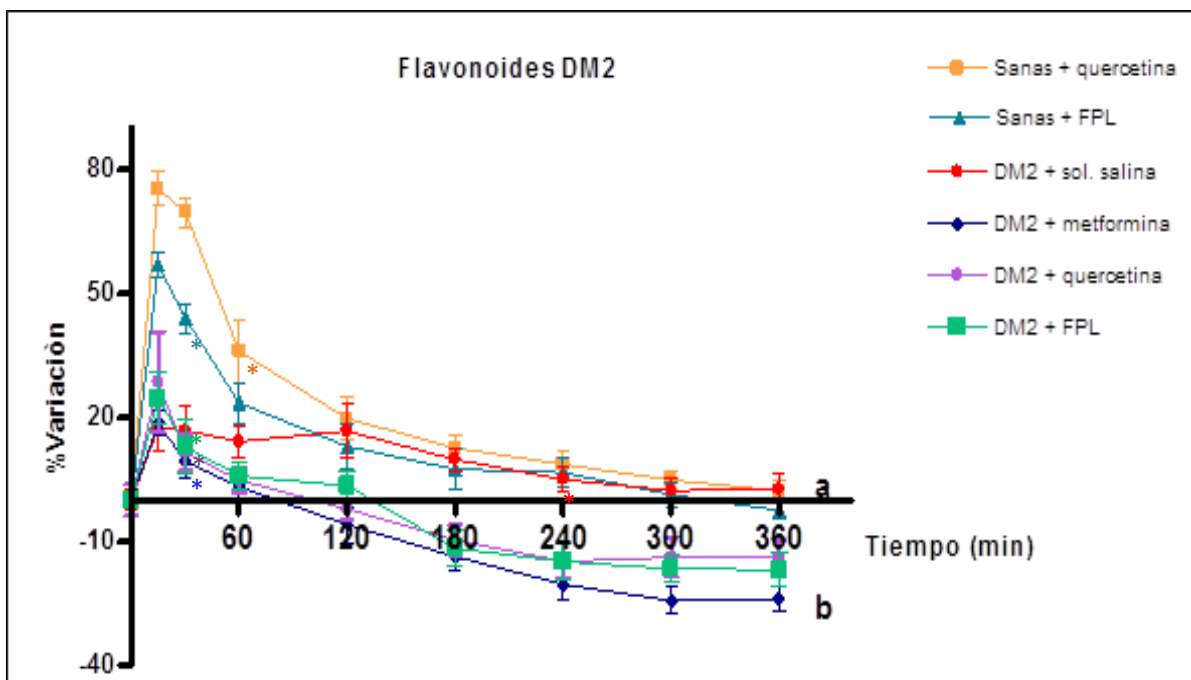
En las figuras 16a y 16b, se aprecia el ensayo realizado en el modelo de DM2 con flavonoides, se puede observar como aquellos grupos de ratas sanas tratadas con la FPL y quercetina se normalizan 30 minutos después de la carga de glucosa y se mantienen dentro de estos valores durante todo el ensayo. Los grupos de ratas tratadas con solución salina no muestran reducción de la glucosa mientras que, las ratas diabéticas tratadas con metformina muestran una reducción de los niveles de glucosa a partir de los 30 minutos con una reducción total del 23%.

El comportamiento observado entre los grupos de ratas tratadas con metformina, FPL y quercetina fue muy similar, ya que los tres grupos presentan porcentajes de reducción de la glucosa de 16%, 14%, y 23% respectivamente sin tener diferencias estadísticamente significativas, donde la reducción de los niveles de glucosa se observa en los tres grupos a partir de los 30 minutos.



**Figura 16a.** Curva de tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 2. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.





**Figura 16b.** Normalización de datos de curva de tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 2. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.

En la tabla 14 se muestran los valores de porcentaje de reducción de la glucosa inicial así como el área bajo la curva.

**Tabla 14.** Porcentaje de reducción y área bajo la curva de curva de tolerancia a la glucosa con flavonoides en diabetes tipo 2.

COMPONENTE	% REDUCCION	AREA BAJO LA CURVA
Solución salina	0% a	100%
Metformina	23% b	77%
Quercetina	14% b	85%
FPL	16% b	84%

Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ).

Una vez que fue evaluado el efecto hipoglucemiante de fenoles y flavonoides presentes en la FPL del berro en un modelo experimental de diabetes tipo 1 y tipo 2, se procedió a probar el efecto hipoglucemiante de las fracciones proteínicas del berro obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.

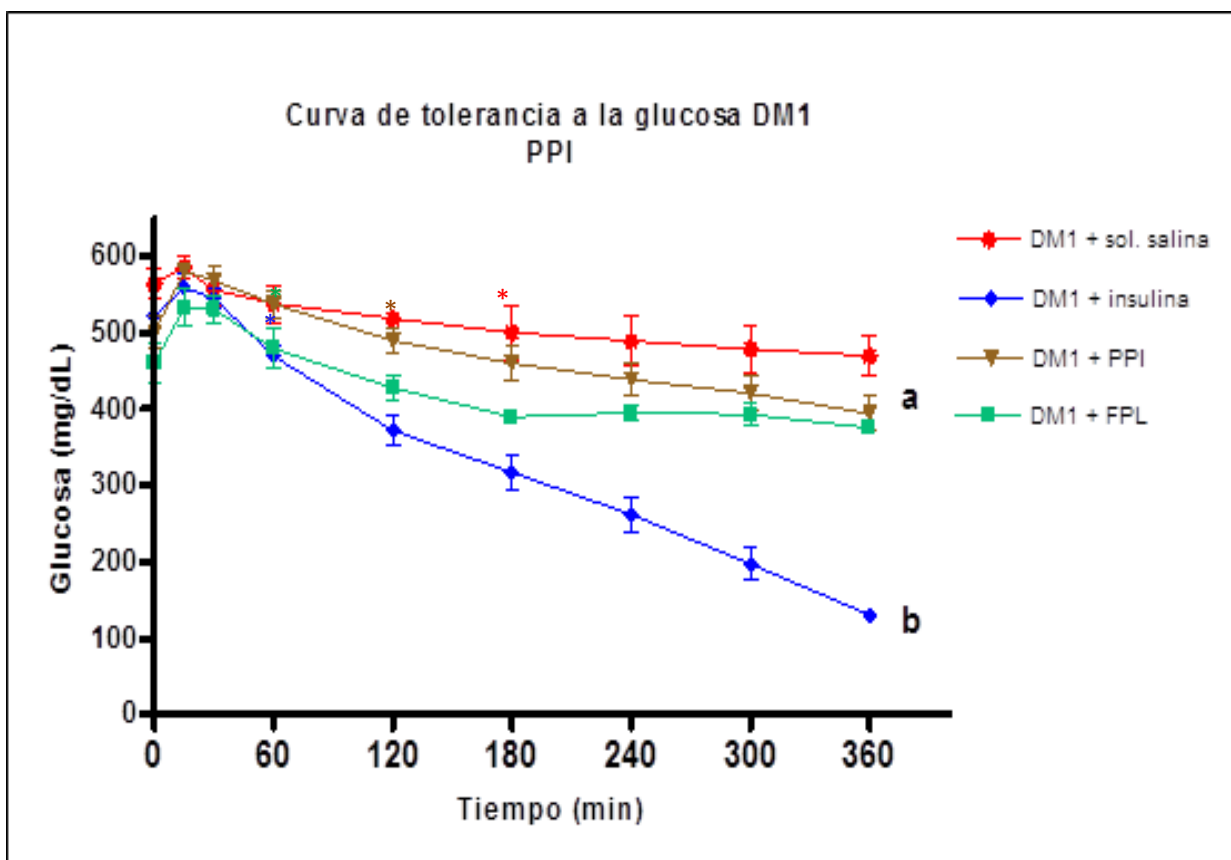
Para este ensayo, las fracciones con mayor concentración de proteína, fueron liofilizadas para su posterior uso en diferentes ensayos y fueron nombradas *péptido parecido a la insulina* (PPI). El efecto hipoglucemiante del PPI purificado del berro fue probado en animales inducidos a diabetes experimental tipo 1, para lo cual se dividieron en 4 grupos de 6 ratas cada uno y fueron tratados con los componentes y las dosis como se muestra en la tabla 15. Para este ensayo tanto el grupo de ratas tratadas con FPL como con PPI fueron administradas vía intradérmica (a diferencia de los ensayos anteriores donde la administración del componente control y la FPL era vía oral), ya que se pretendía realizar la prueba bajo las mismas condiciones en la que es administrada la insulina.

**Tabla 15.** Grupos experimentales curva tolerancia a la glucosa con PPI en diabetes tipo 1.

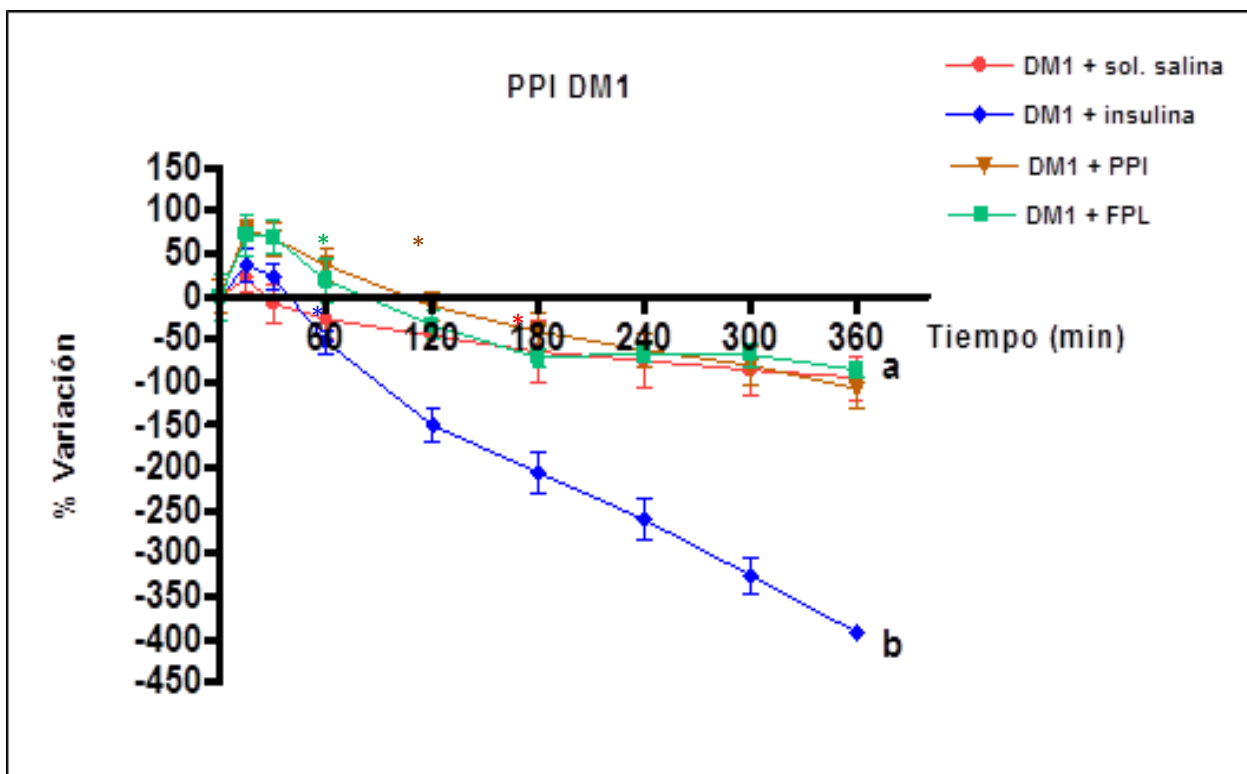
<b>Grupo III</b>	<b>Grupo IV</b>	<b>Grupo V</b>	<b>Grupo VI</b>
Control diabéticas + Solución salina	Grupo diabéticas + insulina	Grupo diabéticas + PPI	Grupo diabéticas + FPL
0.9%	4UI/kg	0.2 mg/kg	900 mg/kg
Vía oral	Vía intradérmica	Vía intradérmica	Vía intradérmica

En las figuras 17a y 17b se muestra el ensayo realizado con el PPI del berro en el modelo experimental de diabetes tipo 1. En estas gráficas se observa como la reducción de la concentración de glucosa en grupo de ratas tratadas con solución salina se mantienen en niveles elevados durante todo el ensayo.

Las ratas tratadas con insulina mostraron una reducción del 75% comenzando a normalizar los valores de glucosa a partir de los 60 minutos. El grupo de ratas tratadas con la FPL y el PPI no muestran diferencia significativa en los porcentajes de reducción ya que presentan valores muy similares de 19% y 22% respectivamente, sin embargo la FPL comienza a descender los niveles de glucosa los 60 minutos mientras que el PPI muestra una reducción significativa hasta los 180 minutos, sin embargo ninguno de estos grupos de ratas logro descender a niveles normales de glucosa y ambos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la insulina.



**Figura 17a.** Curva de tolerancia a la glucosa con PPI en diabetes tipo 1. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.



**Figura 17b.** Normalización de datos de tolerancia a la glucosa con PPI en diabetes tipo 1. Cada uno de los valores representa la media  $\pm$  DE.  $n=6$ . Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ). \* Diferencias significativas entre tiempos.

En la tabla 16 se observan los valores de porcentaje de reducción de la glucosa inicial de cada uno de los compuestos probados así como el área bajo la curva.

**Tabla 16.** Porcentaje de reducción y área bajo la curva de curva de tolerancia a la glucosa con PPI en diabetes tipo 1.

COMPONENTE	% REDUCCION	AREA BAJO LA CURVA
Solución salina	9% a	100%
Insulina	75% b	25%
PPI	22% a	40%
FPL	19% a	31%

Las letras minúsculas indican diferencia significativa ( $P \leq 0.001$ ).

## X.-DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se enfocó en la identificación y purificación del componente activo hipoglucemiante del berro puesto que, en investigaciones anteriores realizadas por el grupo de trabajo del laboratorio de Glicobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, se reportó que las hojas del berro presentan actividad hipoglucemiante al ser probadas en ratas diabéticas inducidas por aloxano. Al separar los componentes del berro en extracto acuoso, acetónico, alcohólico y fracción post-lavados, esta última fue la que demostró una mayor actividad hipoglucemiante (Urquiza-Martínez, 2015).

La fracción post-lavados (FPL) fue obtenida después de realizar varios lavados en las hojas del berro con acetona y posteriormente con alcohol, esto con la finalidad de remover la mayor cantidad de pigmentos contenidos en las hojas. El tratamiento con solventes polares asegura obtener un alto rendimiento de separación de componentes presentes en las plantas, como pigmentos, proteínas, carbohidratos, grasas, entre otros. Los compuestos extraídos y presentes en los solventes se pueden recuperar mediante destilación simple y de esta manera obtener la fracción deseada libre de disolvente.

Una vez obtenidos los extractos *crudo*, *acetónico*, *alcohólico* y *FPL*, se inició con la identificación del componente hipoglucemiante del berro, para ello se realizó la cuantificación de los principales metabolitos secundarios presentes en las plantas los cuales son los compuestos fenólicos. Los resultados mostrados en la tabla 3, 4 y 5 muestran que todos los extractos contienen fenoles, polifenoles y flavonoides en cantidades significativas. La mayor concentración de compuestos se encuentra en el pigmento alcohólico, esto se debe a que los fenoles, polifenoles y flavonoides son de naturaleza polar, por lo que se pueden extraer con mayor facilidad y en una mayor concentración utilizando solventes como el alcohol que posee una polaridad menor a la acetona, donde se cuantificaron en menor proporción estos metabolitos (Delgado-Vargas y col., 2000).

A pesar de haber realizado los lavados acetónicos y alcohólicos en las hojas del berro para la remoción de los pigmentos, se cuantificó la presencia tanto de fenoles como de flavonoides en la FPL, aunque se encontró en menor cantidad en comparación con los extractos acuosos, acetónicos y alcohólicos.

Dada esta relación entre la presencia de compuestos fenólicos y un efecto protector, se procedió a determinar la actividad antioxidante de los diferentes extractos del berro. A pesar de que el extracto alcohólico contenía una mayor cantidad de metabolitos secundarios, el extracto acuoso mostró una EA mayor ya se necesitó menor concentración de este extracto y menor tiempo para inhibir la molécula de DPPH, además de que en este extracto se encuentran concentrados todos los metabolitos secundarios lo que le confiere una mayor actividad antioxidante. También se comparó los valores obtenidos de los controles utilizados durante el ensayo los cuales fueron ácido ascórbico y ácido gálico, con los valores reportados por Brand-Williams (1995), obteniendo los mismos valores, los cuales muestran una EA alta para ácido ascórbico y EA baja para ácido gálico.

Se ha sabe que los compuestos fenólicos pueden tener efectos benéficos sobre la salud humana y proporcionar protección contra diferentes enfermedades (Williamson y Manach, 2005, Umesh y col., 2018). Si bien los fenoles y flavonoides no son producidos por el organismo, se pueden obtener de diferentes fuentes de origen vegetal, como té, café, vino, cereales, verduras, legumbres, frutas y bayas. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día (Martínez-Florez y col., 2002), por lo que todos los extractos del berro poseen una cantidad más alta a la recomendada y que podría representar un efecto benéfico para las personas que lo consumen.

Otro de los componentes que fue cuantificado fueron los carbohidratos, los cuales fueron cuantificados en todos los extractos del berro (tabla 7). Es importante realizar una cuantificación de estos compuestos pues se sabe que pueden favorecer a la homeostasis de la glucosa, además los carbohidratos pueden estar conjugados con algunos metabolitos secundarios como lo son los fenoles y flavonoides, lo que les confiere resistencia a la hidrólisis ácida del estómago y favorece su llegada al intestino, mejorando su absorción (Xiao y Högger, 2014).

Una vez identificada la presencia de metabolitos secundarios y otros componentes como los carbohidratos en la FPL del berro, se inició con el proceso de purificación del componente activo hipoglucemiante, para ello se realizó en primera instancia una cromatografía de exclusión molecular para separar los diferentes componentes presentes en dicha fracción.

En las figuras 5 y 6 se observa que los picos de fenoles y flavonoides son los primeros en aparecer, esto se debe a que estos componentes poseen un mayor tamaño y peso molecular por lo cual no son capaces de atravesar los poros de la membrana y se eluyen principalmente en las primeras fracciones. Además, al poseer una gran variedad de estructuras, se observa como los fenoles y flavonoides se agrupan en diferentes picos, a diferencia de los carbohidratos, que se encuentran en menor cantidad y que poseen un tamaño menor estos eluyen en un solo pico (figura 7).

Cuando se realizó la cuantificación total de fenoles, flavonoides y carbohidratos en las fracciones obtenidas por cromatografía (tabla 8) y estas fueron comparadas con las cantidades determinadas previamente en la FPL, no hubo diferencia estadísticamente significativa, lo que demuestra que se recuperaron la mayoría de los componentes mediante la cromatografía de exclusión molecular.

Otro de los componentes hipoglucemiantes que se han reportado en las plantas son las proteínas. Se han reportado la presencia de proteínas que muestran actividad hipoglucemiante, secuencia de aminoácidos y peso molecular similar a la insulina bovina por lo que han sido denominados péptidos parecidos a la insulina (PPI) (Xavier-Filho et al. 2003, Azevedo et al. 2006, Paula et al, 2017).

Con base a esto, se exploró también la posibilidad de la presencia de proteínas como componente activo en el extracto de berro. Para saber si en la FPL existía alguna proteína que pudiera ser similar a la insulina, se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando insulina como patrón de elución; el patrón de elución obtenido de la insulina (figura 8) se comparó con el cromatograma representativo obtenido de las diferentes proteínas presentes en la FPL del berro (figura 9), y se observó que existen picos de proteínas que coinciden con el pico obtenido del patrón de elución de la insulina, lo que sugiere que existen proteínas con peso y tamaño similar al de la insulina en el berro.

Para determinar la heterogeneidad y el peso molecular aparente de las proteínas presentes en la FPL, se realizó una electroforesis SDS-PAGE, utilizando un marcador de peso molecular establecido y además utilizando como control comparativo la insulina. Bajo condiciones no reductoras (figura 10), la insulina mostro una sola banda, mientras que en el carril de la FPL se observaron siete bandas, coincidiendo en peso molecular aparante con la insulina una de ellas. Cuando se realizó la electroforesis en condiciones reductoras (figura 11), se pudo observar como la insulina presento dos bandas, debido a que las dos cadenas que la conforman, se separan por la ruptura de los puentes disulfuro que las unen.

Además, se observó en condiciones reductoras, dos bandas más que no se observaron anteriormente, lo que sugiere que por lo menos dos de estas proteínas pudieran contener en su estructura puentes disulfuro, sin embargo la proteína de peso similar a la insulina no presento ningún cambio en su patrón de bandeo, lo que sugiere que esta proteína está formada por una sola cadena.



Con la información de que la FPL contenía proteínas con peso molecular aparente similares a la insulina, se utilizaron las fracciones que coincidían con el pico de la insulina para realizar una electroforesis SDS-PAGE en condiciones no reductoras y conocer el peso molecular aparente. En la figura 12 se observa el gel que se realizó en condiciones no reductoras de la proteína del berro y utilizando como control a la insulina, de las que se obtuvo un peso molecular aparente de 5.2 y 5.8 kDa respectivamente. Esta información reafirma que la FPL del berro contiene proteínas con tamaño y peso molecular aparente parecido a la insulina.

Una vez que fueron identificados y cuantificados diferentes componentes hipoglucemiantes que están presentes en la FPL del berro y que además se corroboró la presencia de proteínas con peso molecular aparente similar a la insulina, se inició con la evaluación del efecto hipoglucemiante de los distintos componentes. Para ello se estandarizó el modelo de diabetes tipo 1 inducida con aloxano y el modelo de diabetes tipo 2 con administración de fructosa al 60%.

El primer componente que fue evaluado fueron los fenoles, para ello se eligió el ácido gálico para comparar el efecto que este tenía en las ratas diabéticas, con el efecto hipoglucemiante que se presentaba con la FPL del berro. El ácido gálico (AG) es un compuesto fenólico que se encuentra en diversas fuentes naturales como plantas, frutas y verduras. A éste, se le atribuyen diversos efectos biológicos como actividad antiinflamatoria, antibiótica, protección cardiovascular, anticancerígena y antioxidante (Salas y col., 2013).

En el presente trabajo fue reportada la presencia de componentes fenólicos en la FPL del berro (tabla 3), y se realizó una comparación entre el ácido gálico y la FPL, para conocer si el efecto hipoglucemiante era causado por la presencia de este tipo de compuestos presentes en la FPL.

En las figuras 13 a y 13 b se esquematizan los ensayos realizados con fenoles y en el modelo experimental de diabetes tipo 1, donde se puede apreciar

que el efecto provocado por el ácido gálico es muy diferente al que causó la FPL y la insulina, mientras que en las figuras 14a y 14b, se observa el ensayo realizado en el modelo de diabetes tipo 2, donde, no hubo diferencias significativas entre los grupos de ratas tratadas con ácido gálico, FPL y metformina.

Diversos estudios muestran la capacidad de los compuestos fenólicos, entre ellos el ácido gálico para inhibir enzimas digestivas como la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (Hanhineva y col., 2010, Salas y col., 2013). Estos compuestos pueden establecer interacciones no covalentes con las enzimas debido a la presencia de grupos OH en su estructura los cuales pueden formar enlaces de hidrógeno con el grupo polar de la enzima o interacciones hidrofóbicas, modificándolas y afectando su función, de esta manera se propicia una reduce la tasa de liberación de glucosa, su absorción en el intestino delgado y en consecuencia se reduce la hiperglucemia postprandial, lo cual podría sugerir un mecanismo de acción por el cual los fenoles de la FPL ejercen su efecto hipoglucemiante, sin embargo este efecto logro ser más evidente en el modelo experimental de diabetes tipo 2, comportándose de manera similar a la metformina en cuanto tiempo de acción y porcentaje de reducción.

Cuando se evaluó la actividad hipoglucemiante de los flavonoides presentes en la FPL del berro, se observó que tanto en el modelo de diabetes tipo 1 (figuras 15 a y 15 b) como en el de diabetes tipo 2 (figuras 16a y 16b), no hubo diferencias significativas entre los grupos de ratas tratadas con quercetina, FPL e insulina o metformina.

En múltiples estudios se ha demostrado las propiedades beneficiosas de los flavonoides como la quercetina (Vicente-Vicente y col., 2013) entre ellas, su efecto hipoglucemiante, por lo cual estos resultados no son de sorprender, sin embargo es importante resaltar que, los grupos de ratas con diabetes 1 y 2 tratadas con FPL y quercetina muestran comportamientos muy similares tanto en el tiempo de inicio de acción como en el porcentaje de reducción de glucosa, lo que sugiere

que la quercetina es uno de los componentes hipoglucemiantes presentes en el berro con mayor actividad.

Como ha sido mencionado anteriormente, las plantas poseen péptidos parecidos a la insulina, los cuales son capaces también de controlar los niveles de glucosa al ser probados en diferentes modelos experimentales (Collip, 1923; , Best y Scoot, 1923; Khanna y col., 1974, Paula et al. 2017), por lo cual en este trabajo se evaluó el efecto hipoglucemiante del péptido purificado del berro (PPI), el cual posee un peso molecular aparente muy similar a la insulina (figura 12) y de esta manera conocer si posee también un efecto similar al de la insulina.

En las figuras 17a y 17b se muestra el ensayo realizado con el PPI del berro en el modelo experimental de diabetes tipo 1. En estas gráficas se observa que tanto el grupo de ratas tratadas con la FPL y el PPI no muestran diferencia significativa en los porcentajes de reducción, sin embargo ninguno de estos grupos de ratas logro descender a niveles normales de glucosa y ambos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la insulina.

Si bien estos resultados nos muestra que el PPI obtenido del berro si tiene una ligera actividad hipoglucemiante, no es comparable con la insulina pues muestra un porcentaje de reducción mucho menor. Otro aspecto que vale la pena remarcar, es que a diferencia de los ensayos con fenoles y flavonoides, en los cuales la FPL fue administrada vía oral, en este ensayo en el cual fue administrada vía intradérmica, la capacidad hipoglucemiante se vio afectada pues no se obtuvo el mismo nivel de reducción que en los ensayos anteriores.

En la tabla 17, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en cada ensayo.

**Tabla 17.** Porcentajes de reducción obtenidos en cada ensayo de evaluación de actividad hipoglucemiante.

COMPONENTE	DM 1	DM2
Solución salina	9%	0%
Insulina	75%	N/A
Metformina	N/A	23%
Quercetina	60%	14%
Ácido gálico	30%	15%
FPL	69% b	16%
PPI	29%	N/A

Como se observa en la tabla 17, los resultados obtenidos sugieren que uno de los componentes activos con mayor efecto hipoglucemiante del berro es un flavonoide, dado que, por el comportamiento tan similar entre la quercetina y la FPL se podría pensar que se trata del mismo compuesto.

El efecto hipoglucemiante de algunos extractos de hierbas que contienen flavonoides ya ha sido previamente confirmado en modelos humanos y animales de diabetes mellitus tipo 1 y 2. Los flavonoides pueden mejorar la secreción de insulina a través de la regeneración de células  $\beta$  pancreáticas, aumentan la captación de glucosa mediada por insulina en células diana, así como la captación de  $Ca^{2+}$ , lo que conlleva a un efecto favorecedor de la homeostasis de la glucosa (Bailey y Day, 1989, Hanhineva y col, 2010, Saritha, 2017).

En especial la quercetina puede ejercer un efecto estimulante sobre la liberación de insulina, favoreciendo de esta manera la captación de glucosa; puede reducir significativamente la actividad de glucosa-6-fosfatasa en hepatocitos, enzima encargada de regular la gluconeogénesis, lo que se traduce a que posee potencial para reducir la producción de glucosa hepática (Gregus et al.

2007, Yang y Kang, 2018), también puede influir en la homeostasis de glucosa a nivel de músculo esquelético e hígado favoreciendo translocación de GLUT-4 y mediante mecanismos asociados con la activación de vías de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Eid et al. 2015). Además, la quercetina actúa mediante la inhibición intestinal de la digestión del almidón, así como mediante la protección contra el daño de los islotes pancreáticos (Hanhineva y col, 2010, Manzano y Williamson, 2010, Youl et al. 2010, Xiao y Högger, 2014).

Cada uno de estos mecanismos, aunado al potencial antioxidante que posee la quercetina, podría explicar su efecto hipoglucemiante y sugiere como la quercetina en la FPL del berro podría estar llevando a cabo el efecto hipoglucemiante mostrado tanto en los ensayos realizados en DM1 como en DM2.

## **XI.- CONCLUSIONES**

La fracción post-lavados (FPL) del berro (*Nasturtium officinale*) contiene más de un componente activo, entre los que destacan fenoles, flavonoides y proteínas, los cuales al ser evaluados en modelos experimentales de diabetes tipo 1 y tipo 2 mostraron actividad hipoglucemiante.

El componente activo que tiene la mayor actividad hipoglucemiante es la quercetina, éste flavonoide de la FLP, presenta una actividad hipoglucemiante sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a la insulina al ser probado en un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, mientras que, tanto fenoles y flavonoides presentes en la FPL al evaluarse en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 llevan a cabo un efecto hipoglucemiante muy similar a la metformina, estabilizando los niveles de glucosa a partir de los 30 minutos y manteniéndolos en niveles normales durante el ensayo.

## **XII.- PERSPECTIVAS**

- Continuar con la caracterización bioquímica de los fenoles, flavonoides y proteínas presentes en la FPL del berro.
- Purificar los flavonoides que llevan a cabo el efecto hipoglucemiante del berro.
- Comprobar la presencia de quercetina en la FPL mediante HPLC.
- Realizar la secuenciación de aminoácidos del péptido parecido a la insulina obtenido de la FPL, para comparar su similitud con la insulina.
- Llevar a cabo pruebas de toxicidad con los principios activos hipoglucemiantes del berro.

### XIII.- BIBLIOGRAFIA

- Amaya-Chávez A, Dolores-Ledezma E, Alvarez-Sánchez P, Ferrreira-Rubio G, Gómez-Oliván LM, Galar-Martinez M (2007). Evaluación de un modelo de Diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglucemiante de la glibenclamida. *Rev Mex farmac*, 38(3):5-11.
- American Diabetes Association (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33: S62-S69.
- Asenjo S, Muzzo S, Pérez MV, Ugarte F, Willshaw ME (2007). Consenso en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes tipo 1 del niño y del adolescente. *Rev Chil Pediatr*, 78: 534-541.
- Ayala A, Alfredo A; Mosquera V, Esmeralda; Serna C, Liliana. (2010). Liofilización de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*). *Vitae*, 121-127.
- Azevedo CR, Maciel FM., Silva LB, Ferreira ATS, M. da Cunha, Machado OLT, Fernández KVS, Oliveira AEA and Xavier-Filho J (2006). Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. *Braz J Med Biol Res*, 39(11):1435-1444.
- Bailey CJ, Day C (1989). Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*, 12:553-564.
- Bhattacharya S, Dey D, Roy SS (2007) Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32:405-413.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2008). *Bioquímica*, 6 ed. Editorial Reverte, España. pp. 66-77.
- Berova N, Nakanishi K, Woody RW (2000). *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2ed. Wiley VCH, New York, USA.
- Best CH, Scott MA (1923). Possible sources of insulin. *J. Metabol. Res*, 3:177-179.
- Bloomgarden ZT (2009). A1c: recommendation, debates, and questions. *Diabetes Care*, 32:141-147.



- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm TISS Technol*, 28(1):25-30.
- Broadhurst CL, Polansky MM, Anderson RA (2000). Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem*, 48(3):849-852.
- Carretero ME (2005). Especies vegetales con posible actividad hipoglucemiante. *Panorama Actual Medico*, 29:118-123.
- Chattopadhyay RR (1999). A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J Ethnopharmacol*, 67(3):367-372.
- Cintra DE, Ropelle E, Pauli JR (2007). Regulación central de la ingestión alimentaria y el gasto energético: acciones moleculares de la insulina, la leptina y el ejercicio físico. *Rev Neurol*, 45 (11): 672-682.
- Collip JB (1923). Glucokinin. A new hormone present in plant tissue. Preliminary paper. *J. Biol. Chem*, 56:513-543.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3):173–289.
- Didier HB (1995). La colección de plantas medicinales más importantes de América Latina. *Ciencias* 39:46-47.
- Ebrahimzade MA, Nabavi SM, Nabavi SF, Bahramian F, Bekhradnia AR (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. Var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1):29-34.
- Eid HM, Nachar A, Thong F, Sweeney G, Haddad PS. (2015). The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. *Phcog Mag* 11:74-81.

- Ellis MM, Eyster WH (1923). Some effects of insulin and glucokinase on maize seedlings. *Science*, 58:541-542.
- Escobedo J, Buitrón LV, Velasco MF, Ramírez JC, Hernández R (2009). High prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in urban Latin America: the CARMELA Study. *Diabet Med*, 26:864–871.
- Fasman GD (1996). *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Plenum Publishing Corp. New York, USA.
- Fernandez-Lorenzo P, Lorenzo-Velasquez B, Moreno-Gonzalez A, Leza-Cerro J.C, Moro-Sánchez A (2009). *Farmacología básica y clínica*, 18° ed, Ed. Médica Panamericana, Madrid, España.
- Figueroa-Hernández JL (2009). Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Revista Digital universitaria*, 10(9):36- 42.
- Foster, DW (1999). Diabetes mellitus, En TR. Harrison, AS. Fauci, E. Braunwal, *Principios de medicina interna*, 14ª ed, McGraw-Hill Interamericana, México. pp. 2341-2365.
- Gaikwad Switi B, Krishna Mohan G, Sandhya Rani M (2014). Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, 5, (Suppl 1: M2): 11-28.
- García, Pérez HM (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: Fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(12):31-41.
- Gregus Z, Nemeti B (2007). Glutathione-dependent reduction of arsenate by glycogen phosphorylase responsiveness to endogenous and xenobiotic inhibitors. *Toxicol Sci* 100: 44-53.
- Gutiérrez JP, Rivera Dommarco J, Shamah Levy T, Villalpando Hernández S, Franco A (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. Cuernavaca, México, Instituto Nacional de Salud Pública.
- Guyton AC y HALL JE (2006). *Tratado de Fisiología Médica*. 11ª ed. Ed. Elsevier. p.939

- Hammes GG (2005). Spectroscopy for the Biological Sciences. : John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. pp. 63-84.
- Hanhineva K (2010). Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. *J. Mol. Sci.* 11:1365-1402.
- Harris MI (1996). Atención médica en los pacientes diabéticos. *Ann Intern Med*, 124(2):117-22.
- Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, Smith SR (2004). Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(4):1844-8.
- Heras-Sandoval D, Arias C (2009). Señalización por insulina en el cerebro y su participación en la enfermedad de Alzheimer. *Medigraphic*, 4 (3):117-125.
- Hernández-Hernández R, Champagne BM, Silva H, Vinueza R (2008). Assessment of cardiovascular risk in seven Latin American cities. *Am J Med*, 121:58–65.
- Hii CS, Howell SL Effects of flavonoids on insulin secretion and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  handling in rat islets of Langerhans. *J. Endocrinol*, 107:1-8.
- Hollman PC (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 81(1):317S-325S.
- Islas S, Revilla MC (1999). Diabetes mellitus: concepto y nueva clasificación, En Islas S, Lifshitz A, *Diabetes*, 2<sup>a</sup> ed, McGraw-Hill Interamericana, México. pp. 366-369.
- Jagua A, Marín RA, Granados LA, Ávila V (2008). Insulina cerebral. *Colomb Med*, 39: 107-116.
- Jenkins DJA, Goff DV, Leeds AR, Alberti KGMM, Wolever TMS, Gassull MA, Hockaday TDR (1976). Unabsorbable carbohydrates and diabetes: decreased postprandial hyperglycaemia. *Lancet*, 2:172-174.
- Khanna P, Nag TN, Jain SC, Mohan S (1974). Extraction of insulin from a plant source. 3rd. International Congress on Plant Tissue & Cell Cultures, 21-26th July, Leicester, UK.

- Kramer CK, Araneta M, Barret-Connor E (2010). A1c and diabetes diagnosis: The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*, 33:101-103.
- Krishna-Mohan G, Sandhya-Rani M (2014). Phytochemicals for Diabetes Management. *Pharmaceutical Crops*, 5(1):11-28.
- Le Roith D, Quon MJ, Zick Y (2003) Molecular and cellular aspects of insulin resistance: Implications for diabetes. En: *Signal Transduction and Human Disease*. Editor: Finkel T, Gutkind JS. Hoboken, New Jersey Wiley-Interscience, pp 171-200.
- Manzano S, Williamson G (2010). Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* 54:1773-80.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* XVII (6):271-278.
- McCarthy AM, Elmendorf JS (2007). GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res*, 125:373-388.
- Mendivil-Anaya CO y Sierra-Ariza ID (2005). Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(4):235- 243.
- Mendoza K, Márquez R, Donado A, Echenique O, Mendoza D, Pérez M, Macías V (2005). Fundamentos biomoleculares de la diabetes mellitus. *Duazary*, 2: 135-142.
- Myers MG Jr, White MF (2002). The Molecular Basis of Insulin Action. En: Gruenberg G, Zick Y Taylor and Francis (editores) *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models*. New York. pp 55-87.
- Mukherjee PK, Mukherjee K, Maiti K (2006). Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J. Ethnopharmacol*, 106:1–28.
- Ng TB, Wong CM, Li WW, Yeung HW (1986). Insulin-like molecules in *Momordica charantia* seeds. *J. Ethnopharmacol*, 15:107-117.

- Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A. (2008). Mecanismos de Acción de la Insulina, REB, 27(1): 9-18.
- Oliveira AEA, Sasaki GL, Iacomini M, da Cunha M, Gomes VM, FernÁndes KVS (2001). Isolation and characterization of a galactorhamnan polysaccharide from the seed coat of *Canavalia ensiformis* that is toxic to the *cowpea weevil* (*Callosobruchus maculatus*). Entomol. Exp. Appl, 101: 225-231.
- Olvera-Granados CP, Leo-Amador GE, Hernández-Montiel HL (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? Bol Med Hosp Infant Mex, 6:306-324.
- Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva N° 312. Centro de prensa. Diabetes 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellstrom J, Reinivuo H, Mattila P (2008). Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. J. Nutr, 138, 562–566.
- Pan GY, Huang ZJ, WangGJ, Fawcett JP, Liu XD, Zhao XC, Sun JG, Xie, YY (2003). The antihyperglycaemic activity of berberine arises from a decrease of glucose absorption. Planta Med, 69:632–636.
- Park HJ, Kim DH, Choi JW, Park JH, Han YN (1998). A potent antidiabetic agent from *Kalopanax pictus*. Arch. Pharm. Res, 21:24-29.
- Patel DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S (2012). Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity, Asian Pac J Trop Biomed, 2(5): 411-420.
- Paula PC, Sousa D, Oliveira J, Carvalho A, Alves B, Pereira M, Farias D, Viana M, Santos F, Morais T, Vasconcelos I. (2017). A Protein Isolate from *Moringa oleifera* Leaves Has Hypoglycemic and Antioxidant Effects in Alloxan-Induced Diabetic Mice. Molecules 22(271): 15.

- Paz K, Zick Y (2002) Ser/Thr phosphorylation of insulin receptor signaling molecules and insulin resistance. En: Insulin Signaling: From cultured cells to animal models Editor: Gruenberg G, Zick Y. Taylor & Francis, New York, pp 259-280.
- Pickup JC (2004). Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 27: 813–23.
- Rao AV, Gurfinkel DM (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metabol. Drug Interact*, 17:211-235.
- Rivero R, Betancort Rodríguez JR (2006). Evaluación De La Actividad Antioxidante De Polifenoles De Algas Marinas. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Rodríguez-López CD, Rodríguez-Romero A, Aguilar R, Jiménez ES (2011). Biochemical characterization of a new maize (*Zea mays L.*) peptide growth factor. *Protein Pept Lett*, 18(1):84-91.
- Rojas-Martínez M (2015). Epidemiología de la diabetes en México. En: C. A. Aguilar, Ed. Acciones para enfrentar la diabetes. Documentos de postura, 1º ed, Intersistemas S.A. de C.V., México.
- Sabán Ruíz J, Fabregate M, De la torre N, Sánchez O, Bernal E. (2011). La diabetes mellitus como enfermedad sistémica. Epidemiología y patogenia de las complicaciones crónicas. Ed. Ediciones Díaz de santos, Madrid, España.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414:799-806.
- Samad A, et al. (2009) Status of herbal medicines in the treatment of diabetes: a review. *Curr Diabetes Rev*, 5(2):102-111.
- Sánchez de Jiménez, E, Beltrán-Penã E, Ortiz-López A (1999). Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axis during germination. *Physiol. Plant*, 105:148-154.

- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1997). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J Sci Food Agric*, 76:270-276.
- Saritha M ( 2017). Flavonoids-The Most Potent Poly-phenols as Antidiabetic Agents: An Overview. *Mod Appro Drug Des*. 1(3):1-5.
- Sattanathan S, Dhanapal CK, Umarani R, Manavalan R (2011). Beneficial health effects of rutin supplementation in patients with diabetes mellitus. *J. Appl. Pharm. Sci*, 1(8): 227-231.
- Secretaria de Salud (1994) Norma Oficial Mexicana Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, NOM-015-SSA2-1994. México.
- Silink M (2002). Childhood Diabetes: A Global Perspective. *Horm Res*, 57(1):1–5.
- Silverstein JH y Rosenbloom AL (2001). Type 2 diabetes in children. *Curr Diab Rep*, 1:19-27.
- Singleton V, Orthofer R, Lamuela- Raventós R (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299:152-179
- Switi B, Krishna-Mohan G, Sandhya-Rani M (2014). Phytochemicals for Diabetes Management, *Pharmaceutical Crops*, 5(1):11-28.
- Tránsito-López M (2006). Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante Características, administración y efectos adversos, *OFFARM*, 25(5):15-22.
- Umesh CV, Jamsheer AM, Prasad MA (2018). The role of flavonoids in drug discovery- review on potential applications. *RJLBPCS* 4(1):70-77.
- Valcarcel Cases M (1988). Técnicas analíticas de separación, editorial Reverte, España. pp. 563-567.
- Vessal M, Hemmati M, Vasei M (1985) Hypoglycemic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*, 135:357-364.

- Villalpando S, de la Cruz V, Rojas R, Shamah Levy T, Ávila MA (2010). Prevalence and distribution of type 2 diabetes mellitus in Mexican adult population. A probabilistic survey. *Salud Pública Mex*, 52(1):S19–S26.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 103:931-943.
- Waki I, Kyo H, Yasuda M, Kimura M (1982). Effects of a hypoglycemic component of *Ginseng radix* on insulin biosynthesis in normal and diabetic animals. *J. Pharmacobiodyn*, 5:547-554.
- Warjeet-Singh L (2011). Traditional medicinal plants of Manipur as antidiabetics. *J Med Plants Rev*, 5:677-687.
- Williamson G, Manach C (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. *Am J Clin Nutr* 81(suppl):243S–55S.
- Wong CM, Li WW, Yeung HW (1986). Insulin-like molecules in *Momordica charantia* seeds. *J. Ethnopharmacol*, 15:107-117.
- World Health Organization (1999) (WHO/NCD/NCS/99.2.) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus.
- Xavier-Filho J, Oliveira AE, Belarmino da Silva L, Rocha Azevedo C, Motta Venâncio T, Machado OL, Oliva ML, Fernandes KV and Xavier-Neto J (2003). Plant insulin or glucokinin: a conflicting issue, *Braz. J. Plant Physiol*, 15(1):67-78.
- Xiao J y Högger P (2014). Dietary Polyphenols and Type 2 Diabetes: Current Insights and Future Perspectives. *Current Medicinal Chemistry* 21(1):16.
- Yang DK y Kang H. (2018). Anti-Diabetic Effect of Cotreatment with Quercetin and Resveratrol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biomol Ther* 26(2):130-138.



- Youl E, Bardy G, Magous R, Cros G, Sejalon F, Virsolvy A, et al. (2010). Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic beta-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *Br J Pharmacol* 161:799-814.