



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

“Actividad antihiper glucemiante de tisanas de *Annona diversifolia* Safford en modelo murino diabético experimental.”

PRESENTA
VANESA ALEJANDRA SANDOVAL CABRERA
Matrícula: 201744380

Dra. Martha Sosa Rivadeneyra
Directora de tesis

Dr. Fernando Calzada Bermejo
Director externo de tesis

Dr. Miguel Andrés Valdés Guevara
Asesor externo de tesis

Febrero de 2024

Sitio de realización:

Esta tesis se realizó en la unidad de investigación médica en farmacología-CORSE 2º piso, UMAE. Hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social- IMSS.

Agradecimientos

A la unidad de investigación médica en farmacología del Hospital de especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social por haberme permitido ser una de sus estudiantes.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por acobijarme y formarme como profesional, sin duda elegí a la mejor Universidad.

Al programa Delfín por darme la oportunidad de realizar estancias de investigación e incentivar el espíritu por la ciencia.

A la M.V.Z. Itzel Aguilar, encargada del bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI, así como al personal que labora en las instalaciones, por brindar los animales utilizados en el proyecto y por llevar a cabo el correcto cuidado y alimentación de estos.

A la enfermera Fabiola Ortiz integrante del personal del bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI por apoyarme y estar al pendiente en todo momento durante mi estancia en el bioterio.

A la Dra. Marlen Martínez y a la Dra. Ilda del departamento de sistemas biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) campus Xochimilco por proporcionar los equipos de HPLC para la obtención de los espectros analizados en este proyecto.

A mis guías y compañeros de laboratorio, de quienes aprendí y con quienes compartí largas jornadas July, Nancy, Yoseth, Kari, Lupita, Emy, MC. Jessi, Dra. Carmen, Dr. Jesús, gracias por incluirme en su grupo de trabajo.

A mi directora interna de tesis, Dra. Martha Sosa Rivadeneyra por ser parte importante de este Proyecto.

A mi asesor, Dr. Miguel Andrés Valdés Guevara por instruirme, guiarme, asesorarme, enseñarme, ser paciente y darme la seguridad de lo que era capaz de hacer, muchas gracias Dr.

A mi director externo, Dr. Fernando Calzada Bermejo, por darme la oportunidad de ser su estudiante en la estancia de investigación y seguido brindarme la confianza para ser su tesista de licenciatura, gracias por cada una de las herramientas que en todo momento me brindo y ser paciente conmigo.

Dedicatoria.

Quiero comenzar esta dedicatoria mencionando que gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso amor y confianza que en mí depositaron para que sus esfuerzos y sacrificios culminarán con el éxito, ya que ustedes son y serán mi mayor motor. **Los AMO** infinitamente.

A mi madre **Alejandra Cabrera Ginez**, por haberme enseñado e inculcado valores y herramientas necesarias para afrontar la vida, por demostrarme la fortaleza y valentía que se necesita para salir a delante tras las adversidades. ¡¡GRACIAS MA´ por todo...!!

A mi hermano **Leonardo** y a mi hermanita **Yesenia** por apoyarme en cada una de mis experiencias y ser los mejores compañeros de vida; Por confiar en mí, esperando ser algún día su modelo a seguir y fuente de inspiración porque ustedes lo son para mí. ¡¡Gracias hermanitos...!!

A mis sobrinitos **Eduardo y Axel** por llegar a mi vida cuando más lo necesitaba, por ser el motor y fuente de alegría, ser el motivo para nunca rendirme. Espero ser su guía en este trayecto que van comenzando. ¡¡Gracias mis bebés...!!

A mi cuñada **Mari** por su presencia en mi vida al unirse a nuestra familia y haberme regalado a mis pequeñines. ¡¡Muchas gracias!!

A mi Ángel, quien me vio comenzar este sueño, pero no me pudo ver terminar y me refiero a mi hermano mayor **Gerardo**, que siempre estuvo orgulloso de mí y a quien le prometí concluir la licenciatura. Aunque ya no estás físicamente conmigo, siempre vas en mi andar y te guardo cada día. ¡¡Gracias hermano...!!

Finalmente quiero agradecer a **Dios** por ser mi soporte todos los días de mi vida.

Índice

Índice de figuras.....	viii
Índice de tablas.....	viii
Índice de gráficas.....	ix
Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes.....	3
2.1 Diabetes Mellitus.....	3
2.2 Clasificación de Diabetes Mellitus.....	3
2.2.1 Diabetes mellitus tipo 1.....	4
2.2.2 Diabetes mellitus tipo II.....	5
2.2.3 Diabetes mellitus gestacional.....	6
2.2.4 Otros tipos específicos de diabetes.....	6
2.3 Epidemiología.....	9
2.3.1 Epidemiología a Nivel Mundial.....	9
2.3.2 Epidemiología a Nivel Nacional.....	11
2.4 Tratamiento de Diabetes Mellitus tipo II.....	12
2.4.1 Tratamiento farmacológico de la Diabetes Mellitus tipo II.....	12
2.5 Medicina tradicional.....	18
2.6 <i>Annona diversifolia</i> Safford.....	19
3. Planteamiento del Problema.....	21
4. Justificación.....	21
5. Hipótesis.....	22
6. Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	22

7.	Materiales y Métodos	23
7.1	Animales de laboratorio	23
7.2	Material vegetal	23
7.3	Procedimiento de extracción de plantas	23
7.4	Evaluación de la toxicidad oral aguda.....	23
7.5	Inducción de diabetes experimental.....	24
7.6	Administración oral del extracto in vivo	25
	• Ensayo agudo.....	25
	• Ensayo subcrónico in vivo.....	25
7.7	Pruebas orales de tolerancia a diversos carbohidratos (glucosa, sacarosa y lactosa)	26
	Prueba de Tolerancia Oral a Glucosa (TOG).	26
	Prueba de Tolerancia Oral a Sacarosa (TOS) y Latosa (TOL).	26
7.8	Análisis fitoquímico de <i>Annona diversifolia</i>	27
7.9	Análisis estadístico	28
8.	Resultados.....	29
8.1	Obtención de las tisanas a partir de las hojas de <i>Annona diversifolia</i> Safford.....	29
8.2	Determinación de la toxicidad aguda de las tisanas obtenidas a partir de las hojas de <i>Annona diversifolia</i> Safford y la dosis letal 50 (DL 50).	29
8.3	Determinación de la actividad antihiper glucemiante de las tisanas de <i>Annona diversifolia</i> Safford en ratones con DM II experimental en una prueba aguda y subcrónica.	30
8.4	Realización de pruebas de tolerancia oral a glucosa, sacarosa y lactosa en ratones normoglucémicos y con DM II experimental.	39
8.5	Realización del análisis fitoquímico de las tisanas de <i>Annona diversifolia</i> Safford.....	43
9.	Discusión	49
10.	Conclusión	51
11.	Referencias.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Número total estimado de adultos (20-79 años) con diabetes en 2021. _____	10
Figura 2. Fotografía de hojas, flor, fruta y semillas de <i>A. diversifolia</i> . _____	19
Figura 3. Análisis de HPLC-DAD a 254 nm de EAd-1.5g, EEAd-1.5 g y rutina. _____	47
Figura 4. Análisis de HPLC-DAD a 238 nm del EAd-1.5 g, EEAd-1.5 g, farnesal y farnesol. _____	48

Índice de tablas

Tabla 1. Los 10 principales países o territorios por número de adultos (20-79 años) con diabetes en 2021 y 2045. _____	11
Tabla 2. Condiciones de funcionamiento para flavonoides. _____	27
Tabla 3. Condiciones de funcionamiento para Terpenoides. _____	28
Tabla 4. Promedio del rendimiento obtenido en el proceso de extracción a partir de 0.5, 1.5 y 3 g de hojas de <i>A. diversifolia</i> . _____	29
Tabla 5. Peso promedio de órganos de animales en prueba de toxicidad oral aguda. _____	29
Tabla 6. Valores de glucemia obtenidos en prueba aguda. _____	31
Tabla 7. Fotografías de órganos obtenidos al final de la prueba subcrónica. _____	38
Tabla 8. Comparación de cromatoplasmas de tisanas de <i>A. diversifolia</i> . _____	44
Tabla 9. Factores de retención de tisanas de <i>A. diversifolia</i> . _____	45
Tabla 10. Comparación de cromatoplasmas con muestras de EAd, EAd-1.5g, farnesal y farnesol. _____	45
Tabla 11. Factores de retención de muestras de EAd, EAd, farnesal y farnesol. _____	46

Índice de gráficas

Gráfica 1. Evaluación de órganos en prueba TOA. _____	29
Gráfica 2. Prueba aguda de tisanas de <i>A. diversifolia</i> _____	31
Gráfica 3. Prueba aguda de EAd-1.5 g vs. Controles _____	32
Gráfica 4. Prueba aguda en modelos sanos. _____	32
Gráfica 5. Niveles de glucemia en prueba subcrónica. _____	34
Gráfica 6. Cambio percentual del peso corporal en la prueba subcrónica. _____	34
Gráfica 7. Prueba de HbA1c subcrónica. _____	35
Gráfica 8. Perfil lipídico subcrónico. _____	36
Gráfica 9. Transaminasas séricas subcrónicas. _____	37
Gráfica 10. Peso de órganos al final de la prueba subcrónica. _____	37
Gráfica 11. Tolerancia oral a glucosa en modelos normoglucémicos. _____	39
Gráfica 12. Tolerancia oral a sacarosa en modelos normoglucémicos. _____	40
Gráfica 13. Tolerancia oral a lactosa en modelos normoglucémicos. _____	40
Gráfica 14. Tolerancia oral a glucosa en modelos DM II experimental. _____	41
Gráfica 15. Tolerancia oral a sacarosa en modelos DM II experimental. _____	42
Gráfica 16. Tolerancia oral a lactosa en modelos DM II experimental. _____	42

Abreviaturas

Et al.	“y colaboradores”
%	Porcentaje
CMN S XXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
CO ₂	Dióxido de Carbono
DL50	Dosis Letal 50
DM	Diabetes Mellitus
DM II	Diabetes Mellitus Tipo II
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
EEAd	Extracto etanólico de <i>Annona diversifolia</i>
EAAd	Extracto acuoso de <i>Annona diversifolia</i>
IDF	Federación Internacional de Diabetes
g	Gramos
h	Horas
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía en capa fina
HbA1c	Hemoglobina glicada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
NM	Normoglucémico
Min	Minutos
mg/kg	Miligramo por Kilogramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
SGLT2	Cotransportador de sodio-glucosa tipo 2
TOA	Prueba de Toxicidad Oral Aguda
TOG	Tolerancia oral a la glucosa
TOS	Tolerancia oral a la sacarosa
TOL	Tolerancia oral a la lactosa

1. Introducción

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en la sangre, debido a la falta de producción de insulina, la cantidad suficiente, o cuando no se utiliza de manera eficaz. La insulina es una hormona indispensable que se produce en el páncreas y permite que la glucosa del torrente circulatorio ingrese en las células del cuerpo, donde se convierte en energía. Además de que participa en el metabolismo de las proteínas y las grasas. Si no se controla el déficit de insulina a largo plazo, muchos de los órganos del cuerpo pueden resultar dañados, lo que derivará en complicaciones de la salud incapacitantes y potencialmente mortales, como las enfermedades cardiovasculares, lesión de los nervios, enfermedad renal y afección ocular. Sin embargo, si se logra un tratamiento apropiado de la diabetes, estas graves complicaciones se pueden retrasar o prevenir totalmente (IDF Diabetes Atlas, 2021).

En México la Diabetes Mellitus tipo II (DM II) ocupa de los primeros lugares dentro de las principales causas de mortalidad con un incremento de casos constante, por lo que la prevención y el control es un reto para la salud pública del país. Además, como resultado del estilo de vida no saludable que frecuenta la mayoría de la población mexicana, con hábitos de alimentación deficientes, sedentarismo, sumados a la carga genética, el estrés psicosocial y el tabaquismo, todos ellos constituyen los principales factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad, considerando lo anterior, su prevención y control son necesidades cada vez más urgentes (Flores, 2016).

La presente investigación hace referencia a una alternativa de tratamiento para la diabetes mellitus, basado en la medicina tradicional empleando tisanas (extractos acuosos) de hojas de *Annona diversifolia* Safford. La problemática que se atenderá nos obliga a mencionar que teniendo conocimiento de la existencia de diversos tratamientos farmacológicos, a pesar de su actividad terapéutica, todos ellos poseen efectos secundarios, en este sentido, se pretende reducir o evitar en gran medida para no dañar el estado de salud de los pacientes que padecen esta enfermedad con la propuesta de utilizar tisanas como tratamiento de la diabetes mellitus, motivo por el cual se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

2. Antecedentes

2.1 Diabetes Mellitus

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la diabetes es una enfermedad crónica que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede usar eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula la glucosa en sangre, que se produce en el páncreas y permite que la glucosa del torrente circulatorio ingrese en las células del cuerpo en donde se convierte en energía, además es fundamental para el metabolismo de las proteínas y las grasas. La falta de insulina o la incapacidad de las células para responder a ella provoca hiperglucemia, también llamada glucosa en sangre elevada, que es un efecto común de la diabetes no controlada y con el tiempo conduce a daños graves a muchos de los sistemas del cuerpo, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. Los síntomas de la diabetes pueden ocurrir repentinamente, dentro de ellos se incluyen: sensación de mucha sed (polidipsia), necesidad de orinar con más frecuencia de lo habitual (poliuria), incremento en la sensación de hambre (polifagia), visión borrosa, sensación de cansancio y/o perder peso involuntariamente (OMS, 2023).

2.2 Clasificación de Diabetes Mellitus

La clasificación de la DM se basa fundamentalmente en su etiología y características fisiopatológicas. Dicha clasificación contempla cuatro grupos y se puede clasificar en las siguientes categorías generales:

- Diabetes tipo 1 (debido a la destrucción autoinmune de células β , que generalmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina, incluida la diabetes autoinmune latente de la edad adulta).
- Diabetes tipo 2 (debido a una pérdida progresiva no autoinmune de la secreción adecuada de insulina de células β con frecuencia en el contexto de la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico).
- Diabetes mellitus gestacional (diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no era claramente diabetes manifestada antes de la gestación).
- Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como diabetes neonatal y diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis) y diabetes inducida por medicamentos o productos químicos (como con el uso de glucocorticoides,

en el tratamiento del VIH / SIDA o después de un trasplante de órganos) (ElSayed et al., 2023).

2.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes tipo 1, es causada por una deficiencia absoluta de secreción de insulina en donde los individuos con mayor riesgo de desarrollar este tipo de diabetes pueden identificarse por evidencia serológica de un proceso patológico autoinmune que ocurre en los islotes pancreáticos y por marcadores genéticos. Además, este tipo de diabetes se divide a su vez en:

- Diabetes inmunomediada

Esta forma de diabetes representa entre el 5-10% de las personas con diabetes, anteriormente conocida como diabetes insulino dependiente o diabetes juvenil, que resulta de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Los marcadores de la destrucción inmune de las células β incluyen autoanticuerpos contra las células de los islotes, autoanticuerpos contra la insulina, autoanticuerpos contra GAD (GAD65) y autoanticuerpos contra la tirosina fosfatasa IA-2 e IA-2 β . Uno y generalmente más de estos autoanticuerpos están presentes en el 85-90% de los individuos cuando se detecta inicialmente hiperglucemia en ayunas. Además, la enfermedad tiene asociaciones con el antígeno leucocitario humano (HLA), con vinculación a los genes DQA y DQB, así como por los genes DRB. Dichos alelos HLA-DR/DQ pueden ser predisponentes o protectores.

En esta forma de diabetes, la tasa de destrucción de células β es bastante variable, siendo rápida en algunos individuos (principalmente bebés y niños) y lenta en otros (principalmente adultos).

Algunos pacientes, particularmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad, mientras que otros tienen hiperglucemia en ayunas moderada que puede cambiar rápidamente a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis en presencia de infección o estrés. Otros pacientes, particularmente adultos, pueden retener la función residual de las células β suficiente para prevenir la cetoacidosis durante muchos años; dichas personas eventualmente se vuelven dependientes de la insulina para sobrevivir y están en riesgo de cetoacidosis. En esta última etapa de la enfermedad, hay poca o ninguna secreción de insulina, manifestándose con niveles bajos o indetectables de péptido C en plasma.

La diabetes mediada por el sistema inmunitario ocurre comúnmente en la infancia y la adolescencia, pero puede ocurrir a cualquier edad e incluso estos pacientes también son propensos a otros trastornos autoinmunes como la enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, vitiligo, esprúe celíaco, hepatitis autoinmune, miastenia gravis y anemia perniciosa (American Diabetes Association, 2014).

- **Diabetes idiopática**

Este tipo de diabetes no tiene etiologías conocidas ya que algunos de estos pacientes tienen insulinopenia permanente y son propensos a la cetoacidosis, pero no tienen evidencia de autoinmunidad. A pesar de que solo es una minoría de pacientes con diabetes tipo 1 que entran en esta categoría, la mayoría de los que lo hacen son de ascendencia africana o asiática. Las personas con esta forma de diabetes sufren de cetoacidosis episódica y presentan diversos grados de deficiencia de insulina entre los episodios. Esta forma de diabetes es fuertemente hereditaria, carece de evidencia inmunológica para la autoinmunidad de las células β y no está asociada con HLA (American Diabetes Association, 2014).

2.2.2 Diabetes mellitus tipo II

La diabetes mellitus tipo II (DM II) representa entre el 90-95% de las personas con diabetes, conocida como diabetes no insulino dependiente o diabetes tipo II, en donde se incluyen las personas que tienen resistencia a la insulina y frecuentemente tienen una deficiencia de insulina relativa. Generalmente al inicio y a lo largo de su vida estas personas no necesitan tratamiento con insulina para sobrevivir. Probablemente existen muchas causas diferentes de esta forma de diabetes, aunque no se conocen las etiologías específicas, en este tipo de diabetes, no se produce la destrucción autoinmune de las células β .

La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos y la obesidad causa cierto grado de resistencia a la insulina, mientras que los pacientes que no son obesos según los criterios de peso pueden tener un mayor porcentaje de grasa corporal distribuida predominantemente en la región abdominal. La cetoacidosis rara vez ocurre espontáneamente en este tipo de diabetes y cuando ocurre surge en asociación con el estrés de otra enfermedad, como una infección. Esta forma de diabetes con frecuencia no se diagnostica durante muchos años porque la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en etapas más tempranas a menudo no es lo suficientemente grave como para que el paciente note cualquiera de los síntomas clásicos de la diabetes, sin embargo, estos pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares.

Mientras que los pacientes con esta forma de diabetes pueden tener niveles de insulina que parecen normales o elevados, se esperaría que los niveles más altos de glucosa en sangre en estos pacientes diabéticos resultaran en valores de insulina aún más altos si su función de β células hubiera sido normal. Por lo tanto, la secreción de insulina es defectuosa en estos pacientes e insuficiente para compensar la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina

puede mejorar con la reducción de peso y / o el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, pero rara vez se restaura a la normalidad.

El riesgo de desarrollar esta forma de diabetes aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física. Además, ocurre con mayor frecuencia en mujeres con DMG previa, en individuos con hipertensión o dislipidemia y su frecuencia varía en diferentes subgrupos raciales y/o étnicos. A menudo se asocia con una fuerte predisposición genética, más que la forma autoinmune de la diabetes tipo I. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no está completamente definida (American Diabetes Association, 2014).

2.2.3 Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus gestacional (DMG) se define como una alteración del metabolismo de los carbohidratos, de severidad variable, que se inicia o reconoce por primera vez durante el embarazo. Se aplica independientemente de si se requiere o no insulina, o si la alteración persiste después del embarazo y no excluye la posibilidad de que la alteración metabólica haya estado presente antes de la gestación. La mayoría de los casos normalizan su glucemia con la resolución del embarazo. Sin embargo, el riesgo de tener diabetes a mediano plazo es mucho mayor. Los casos requieren vigilancia a largo plazo y la implementación de medidas preventivas de la enfermedad.

La DMG se presenta en mujeres cuya capacidad secretora de insulina no llega a superar la reducida acción de la insulina causada por la producción de hormonas de la placenta (resistencia a la insulina). Los factores de riesgo de desarrollar DMG son: edad avanzada, sobrepeso y obesidad, haber tenido DMG anteriormente, aumento excesivo de peso durante el embarazo, antecedentes familiares de diabetes, síndrome de ovario poliquístico, tabaquismo y los antecedentes de mortinatalidad o de haber dado a luz a un niño con una enfermedad congénita (Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2019).

2.2.4 Otros tipos específicos de diabetes

- Defectos genéticos de la célula β

Varias formas de diabetes están asociadas con defectos monogénicos en la función de las células β , estas formas de diabetes se caracterizan con frecuencia por la aparición de hiperglucemia a una edad temprana (antes de los 25 años). Se conocen como diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY) y se caracterizan por una secreción de insulina alterada con defectos mínimos o nulos en la acción de la insulina y se heredan con un patrón autosómico dominante. Hasta la fecha se han identificado anomalías en seis loci genéticos en diferentes

cromosomas. La forma más común se asocia con mutaciones en el cromosoma 12 en un factor de transcripción hepático denominado factor nuclear de hepatocitos (HNF)-1 α . Una segunda forma se asocia con mutaciones en el gen de la glucoquinasa en el cromosoma 7p y da lugar a una molécula de glucoquinasa defectuosa, la glucoquinasa se encarga de convertir la glucosa en glucosa-6-fosfato, cuyo metabolismo a su vez estimula la secreción de insulina por la célula β y por lo tanto debido a defectos en el gen de la glucoquinasa, el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa es necesario para provocar niveles normales de secreción de insulina. Otras formas menos comunes de estos defectos monogénicos son mutaciones en otros factores de transcripción, incluidos HNF-4 α , HNF-1 β , factor promotor de insulina (FPI)-1 y NeuroD1. (American Diabetes Association, 2014).

- Defectos genéticos en la acción de la insulina

Existen causas inusuales de diabetes que resultan de anomalías genéticamente determinadas de la acción de la insulina. Estas anomalías metabólicas asociadas con mutaciones del receptor de insulina pueden variar desde hiperinsulinemia e hiperglucemia moderada hasta diabetes grave. Algunos individuos con estas mutaciones pueden tener acantosis nigricans, las mujeres pueden estar virilizadas y tener ovarios quísticos agrandados a este síndrome se denominaba resistencia a la insulina tipo A. El leprechaunismo y el síndrome de Rabson-Mendenhall son dos síndromes pediátricos que tienen mutaciones en el gen del receptor de insulina con alteraciones posteriores en la función del receptor de insulina y resistencia extrema a la insulina. El primero tiene rasgos faciales característicos y suele ser fatal en la infancia, mientras que el segundo se asocia con anomalías de los dientes, las uñas e hiperplasia de la glándula pineal (American Diabetes Association, 2014).

- Enfermedades del páncreas exocrino

Cualquier proceso que dañe difusamente el páncreas puede causar diabetes. Los procesos adquiridos incluyen pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía y carcinoma pancreático. Con la excepción de la causada por el cáncer, el daño al páncreas debe ser extenso para que ocurra la diabetes ya que los adenocarcinomas que involucran solo una pequeña porción del páncreas se han asociado con la diabetes. Esto implica un mecanismo distinto de la simple reducción de la masa de las células β ya que, si es lo suficientemente extensa, la fibrosis quística y la hemocromatosis también dañarán las células β y afectarán la secreción de insulina. La pancreatopatía fibrocalculosa puede ir acompañada de dolor abdominal que se irradia a la espalda y calcificaciones pancreáticas identificadas en el examen de rayos X. La fibrosis

pancreática y los cálculos de calcio en los conductos exocrinos se han encontrado en la autopsia (American Diabetes Association, 2014).

- Endocrinopatías

Varias hormonas como la hormona del crecimiento, cortisol, glucagón, epinefrina antagonizan la acción de la insulina. Las cantidades excesivas de estas hormonas (acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma, respectivamente) pueden causar diabetes. Esto generalmente ocurre en individuos con defectos preexistentes en la secreción de insulina y la hiperglucemia generalmente se resuelve cuando se resuelve el exceso de hormonas. Los somatostatatomas y la hipopotasemia inducida por aldosteronoma pueden causar diabetes al inhibir la secreción de insulina (American Diabetes Association, 2014).

- Diabetes inducida por medicamentos o sustancias químicas

Muchos medicamentos pueden afectar la secreción de insulina. Estos medicamentos pueden no causar diabetes por sí mismos, pero pueden precipitar la diabetes en individuos con resistencia a la insulina. En tales casos la clasificación no está clara porque se desconoce la secuencia o la importancia relativa de la disfunción de las células β y la resistencia a la insulina. Ciertas toxinas como Vacor (un veneno para ratas) y pentamidina intravenosa pueden destruir permanentemente las células β pancreáticas. También hay muchos medicamentos y hormonas que pueden afectar la acción de la insulina como es el caso del ácido nicotínico y los glucocorticoides. Además, se ha informado que los pacientes que reciben α -interferón desarrollan diabetes asociada con anticuerpos de células de los islotes y en ciertos casos, deficiencia grave de insulina (American Diabetes Association, 2014).

- Formas poco comunes de diabetes mediada por el sistema inmunitario

En esta categoría solo hay dos condiciones conocidas y es muy probable que ocurran otras. El síndrome del hombre rígido es un trastorno autoinmune del sistema nervioso central caracterizado por rigidez de los músculos axiales con espasmos dolorosos, los pacientes generalmente tienen títulos altos de los autoanticuerpos GAD y aproximadamente un tercio desarrollará diabetes.

Los anticuerpos anti-receptores de insulina pueden causar diabetes al unirse al receptor de insulina, bloqueando así la unión de la insulina a su receptor en los tejidos diana. Sin embargo, en algunos casos estos anticuerpos pueden actuar como un agonista de la insulina después de unirse al receptor y por lo tanto causar hipoglucemia. Los anticuerpos anti-receptores de insulina

se encuentran ocasionalmente en pacientes con lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades autoinmunes. Al igual que en otros estados de resistencia extrema a la insulina, los pacientes con anticuerpos anti-receptores de insulina a menudo tienen acantosis nigricans y este síndrome se denominaba resistencia a la insulina tipo B (American Diabetes Association, 2014).

- Otros síndromes genéticos a veces asociados con la diabetes

Muchos síndromes genéticos se acompañan de una mayor incidencia de diabetes, estos incluyen las anomalías cromosómicas del síndrome de Down, el síndrome de Klinefelter y el síndrome de Turner. El síndrome de Wolfram es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por diabetes con deficiencia de insulina y la ausencia de células β en la autopsia. Las manifestaciones adicionales incluyen diabetes insípida, hipogonadismo, atrofia óptica y sordera neural (American Diabetes Association, 2014).

- Infecciones

Ciertos virus se han asociado con la destrucción de células β . La diabetes ocurre en pacientes con rubéola congénita, aunque la mayoría de estos pacientes tienen HLA y marcadores inmunes característicos de la diabetes tipo 1. Además, el virus Coxsackie B, el citomegalovirus, el adenovirus y las paperas han sido implicados en la inducción de ciertos casos de la enfermedad (American Diabetes Association, 2014).

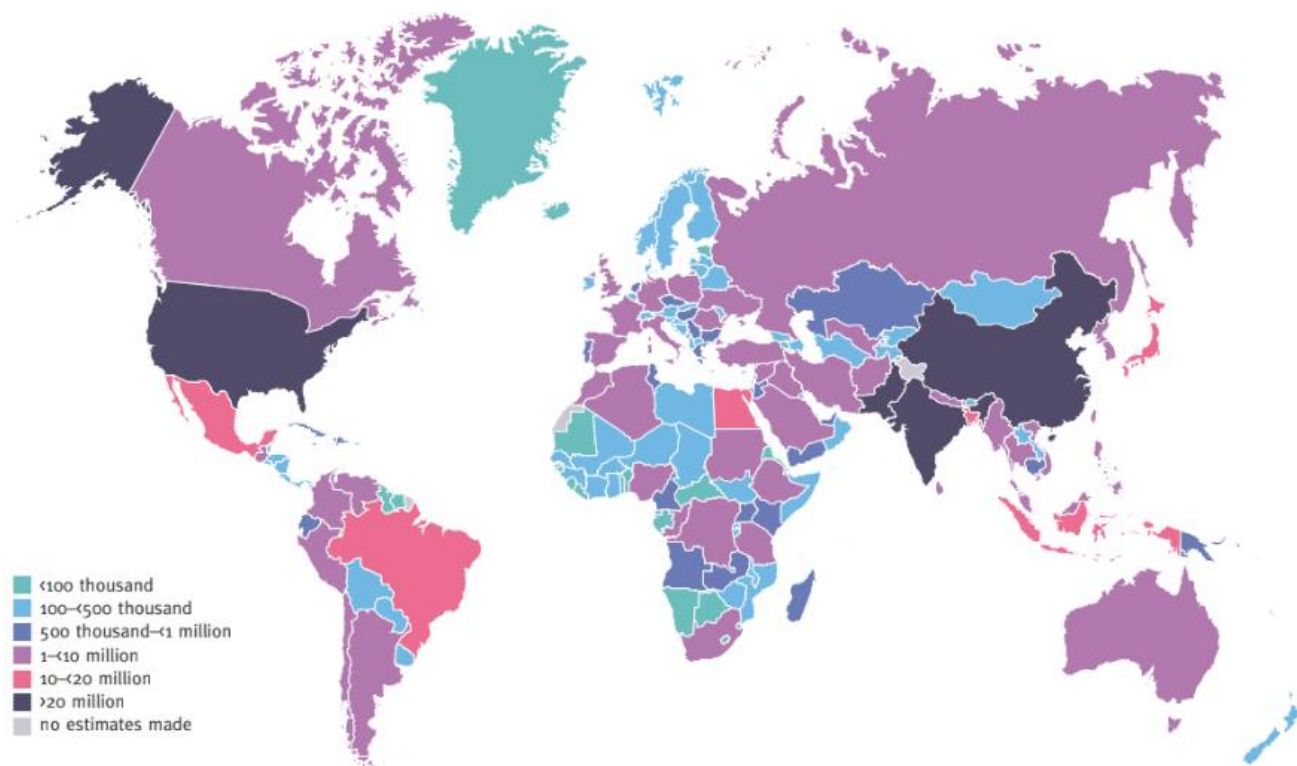
2.3 Epidemiología

La Diabetes Mellitus tipo II es una enfermedad crónica que afecta a millones de adultos en todo el mundo, lo que la convierte en un reto para los sistemas de salud.

2.3.1 Epidemiología a Nivel Mundial

De acuerdo con el Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) se estima que la prevalencia de la diabetes hasta el año 2021 para adultos de 20 a 79 años que incluye diabetes tipo I y tipo II, así como diabetes diagnosticada y no diagnosticada, corresponde a 537 millones en todo el mundo (es decir, el 10,5% de todos los adultos de este grupo de edad), distribuidos como se muestra en la Figura 1. Se predice que para el año 2030, sumen 643 millones y para 2045, se prevé que 783 millones de adultos de 20 a 79 años vivirán con diabetes. Por lo que se estima que la población mundial crecerá un 20% durante este período y se estima que el número de personas con diabetes aumentará un 46% (IDF Diabetes Atlas, 2021).

Figura 1. Número total estimado de adultos (20-79 años) con diabetes en 2021.



La figura muestra los números aproximados de adultos con diabetes en cada país, en 2021. Fuente: IDF Diabetes Atlas, 2021.

Las estimaciones de la diabetes hasta el 2021 muestran una prevalencia creciente de la diabetes por edad. La prevalencia es más baja entre los adultos de 20 a 24 años (2,2% en 2021) y se estima que la prevalencia de la diabetes entre los adultos de 75 a 79 años es del 24,0% en 2021 y se prevé que aumente al 24,7% en 2045. El envejecimiento de la población mundial producirá una proporción creciente de personas con diabetes de más de 60 años (IDF Diabetes Atlas, 2021).

En cuanto a la distribución por género, la prevalencia estimada de diabetes en mujeres de 20 a 79 años es ligeramente inferior a la de los hombres 10.2% (mujeres) frente a 10,8% (hombres). Esto significa que hasta el 2021, hay 17,7 millones de hombres más que mujeres que viven con diabetes (IDF Diabetes Atlas, 2021).

En cuanto a la distribución por países, los países con el mayor número de adultos con diabetes de 20 a 79 años en 2021 son China, India, Pakistán en donde se incluye México en la posición número siete, además se prevé que sigan siéndolo en 2045 (Tabla 1). Los países que tienen el mayor número de las personas con diabetes no necesariamente tienen la mayor

prevalencia ya que la prevalencia se refiere a la proporción de individuos que padecen DM II en una población (IDF Diabetes Atlas, 2021).

Tabla 1. Los 10 principales países o territorios por número de adultos (20-79 años) con diabetes en 2021 y 2045.

2021			2045		
Rango	País o territorio	Número de personas con diabetes (Millones)	Rango	País o territorio	Número de personas con diabetes (Millones)
1	China	140.9	1	China	174.4
2	India	74.2	2	India	124.9
3	Pakistán	33.0	3	Pakistán	62.2
4	Estados Unidos de América	32.2	4	Estados Unidos de América	36.3
5	Indonesia	19.5	5	Indonesia	28.6
6	Brasil	15.7	6	Brasil	23.2
7	México	14.1	7	Bangladesh	22.3
8	Bangladesh	13.1	8	México	21.2
9	Japón	11.0	9	Egipto	20.0
10	Egipto	10.9	10	Turquía	13.4

La tabla muestra los números aproximados de adultos con diabetes de los 10 principales países, en 2021. Fuente: IDF Diabetes Atlas, 2021.

2.3.2 Epidemiología a Nivel Nacional

En México la DM II causó el 13 % de las defunciones hasta el año 2021 (equivalente a 140 729 personas) de acuerdo con las Estadísticas de Defunciones Registradas. Del total de las personas que fallecieron por diabetes, el 74,9 % no era insulino dependiente (correspondiente a 105 395 personas), mientras que el 2,2 % lo era (3 109 personas). En cuestión del género hasta el 2021, del total de defunciones por diabetes, 51 % correspondió a hombres (71 330) y 49 % a mujeres (69 396). Además, a nivel nacional, la tasa de mortalidad por diabetes mellitus fue de 11.0 por cada 10 mil habitantes (INEGI, 2022).

En México la prevalencia de prediabetes de acuerdo con la ENSANUT 2022 fue de 22.1% (equivalente a 17.6 millones de personas). Se observó una mayor prevalencia de prediabetes a mayor edad y en los estratos más bajos de escolaridad y nivel socioeconómico. En México hasta el 2022 la prevalencia de diabetes diagnosticada y no diagnosticada fue de 12.6% y 5.8%, respectivamente, para una prevalencia de diabetes total de 18.3% (equivalente a 14.6 millones de personas). La prevalencia de diabetes diagnosticada y total fue mayor a mayor edad y a menor

nivel educativo. Se estimó que 31.7% de las personas con diabetes desconocen su diagnóstico, con un porcentaje mayor en menores de 40 años (65.6%) que en adultos de 60 o más (18.1%). También se encontró un mayor porcentaje de las personas no diagnosticadas en las personas con nivel socioeconómico bajo y sin derechohabencia (Basto et al., 2023).

2.4 Tratamiento de Diabetes Mellitus tipo II

La diabetes es una de las mayores emergencias sanitarias de salud a nivel mundial del siglo XXI. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023) estima que la glucosa elevada es el tercer factor de riesgo principal para la mortalidad prematura, detrás de la presión arterial alta y el tabaquismo. El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones (agudas y crónicas), mejorar la calidad de vida, así como de reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones (NOM-015-SSA2-2010).

En las personas con glucosa anormal en ayuno y/o intolerancia a la glucosa, como primera acción se recomienda la intervención no farmacológica es decir modificaciones en el comportamiento de estilo de vida (que incluya una dieta sana, actividad física regular, no fumar y el mantenimiento de un peso corporal saludable), el autocontrol de la diabetes, la educación y el apoyo, así como evitar la inercia clínica y los determinantes sociales de la salud, dicho cambio es por tiempo indefinido. Para los pacientes que no responden a la intervención en el estilo de vida, el tratamiento farmacológico puede ser una opción porque se ha demostrado que previene la progresión de la diabetes mellitus tipo II (NOM-015-SSA2-2010; Mellado, 2019).

La farmacoterapia debe iniciarse en el momento en que se diagnostica la DM II, a menos que haya contraindicaciones. La terapia farmacológica debe considerar enfoques farmacológicos que proporcionen la eficacia para lograr los objetivos del tratamiento. (Naha et al., 2023). La elección del tratamiento debe guiarse por factores de tratamiento centrados en cada paciente, dicha elección dependerá de la potencia para reducir la HbA1c, el riesgo de inducir hipoglucemias, el grado de control previo, la influencia en el peso corporal y la dislipidemia, del impacto sobre la glucemia basal o prandial, de las complicaciones o patologías asociadas que presente el paciente, del riesgo de efectos adversos relacionados con el fármaco, de la tolerancia y del costo (Torre et al., 2011).

2.4.1 Tratamiento farmacológico de la Diabetes Mellitus tipo II

En la actualidad existen diversos agentes para el tratamiento de la DM II. El paciente con DM I así como aquel con DM II pueden ser susceptibles para recibir insulina, pero los

hipoglucemiantes orales están indicados exclusivamente en la DM II. (Arellano et al., 2015). Los medicamentos que pueden utilizarse para el control de la DM II son las biguanidas, sulfonilureas, glinidas (Meglitinidas), inhibidores de la enzima α -glucosidasa, tiazolidinedionas, terapias basadas en incretinas como: análogos del receptor de GLP-1 e inhibidores de la DPP-4, inhibidores de los cotransportadores renales de sodio y Glucosa tipo 2 (SGLT2), o las combinaciones de estos medicamentos los cuales tienen la aprobación de la indicación del tratamiento de la DM II, por parte de la Secretaría de Salud en México (NOM-015-SSA2-2010).

Biguanidas

Son la familia de fármacos antiguamente más utilizados como hipoglucemiantes orales, desde 1957. Su mecanismo de acción es complejo debido a que actúa disminuyendo la producción hepática de glucosa y aumentando a su vez la captación de esta por el músculo esquelético, mediante la activación de la enzima AMP-cinasa, lo que provoca la activación de la proteína SREBP (proteína de unión a elemento regulador del estero) ubicada en la membrana del retículo endoplásmico rugoso y que participa en la regulación de varias enzimas reguladoras de las vías del metabolismo intermedio, por otra parte inhibe la lipogénesis y activa la β -oxidación. Además, disminuye la gluconeogénesis y las concentraciones de glucagón plasmático (González & Ortíz, 2012).

El único representante de esta familia actualmente utilizado es la metformina, que tiene un efecto anorexigénico moderado, así como también está indicado como primera opción en individuos donde predomina la resistencia a la insulina sobre la deficiencia en secreción, además su uso puede ampliarse en combinación con sulfonilureas en pacientes no suficientemente controlados. Su efecto secundario recurrente es la intolerancia gástrica como pirosis y diarrea, aunque es mejor tolerada después de las primeras semanas de administración, la dosis mínima es de 1 gr/día (dosis máxima 3 gr/día) pero en forma ascendente, para limitar las molestias gastrointestinales, otro efecto es que interfiere en la absorción de vitamina B12 y por último el efecto más temible es la acidosis láctica (Arellano et al., 2015). Por este motivo, su uso debe ser cuidadoso o contraindicarse en personas con: nefropatía crónica, funcionamiento hepático muy disminuido, insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia respiratoria, que abusan del alcohol y con antecedentes de acidosis láctica (Organización Panamericana de Salud, 2020).

Sulfonilureas

Las sulfonilureas son secretagogos de insulina que ejercen un efecto hipoglucemiante actuando a nivel pancreático, su mecanismo de acción se concentra en inhibir los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}) situado en las células β del páncreas, además promueven la liberación de insulina a largo plazo. Esta interacción origina el cierre de los canales K_{ATP} , que a su vez

reduce la salida de potasio y ocasiona la despolarización de la membrana, provocando de esta manera la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, por consiguiente, el aumento de calcio intracelular lo que provocará la fusión de los gránulos transportadores de insulina con la membrana celular logrando la secreción de la insulina (González et al., 2012). Además, tienen efectos extrapancreáticos que desencadena el aumento de la sensibilidad tisular a la insulina y son fármacos de primera elección cuando hay predominio de la deficiencia de secreción de insulina sobre la resistencia a esta (Arroyo et al., 2020).

Las sulfonilureas se agrupan en generaciones, la primera generación (acetohexamida, clorpropamida, tolazamida y tolbutamida) que ha sido reemplazada por la segunda generación (gliclazida, glimepirida, gliquidona, glipizida y glibenclamida). En cuanto a sus efectos secundarios, la hipoglucemia es el más frecuente, aunque no suele ser grave de igual manera suele estar acompañado de un aumento de peso, por lo que su uso está contraindicado en pacientes de padecen de Insuficiencia renal grave, insuficiencia hepática grave y/o alergia a sulfamidas (Arellano et al., 2015).

Glinidas (Meglitinidas)

Las glinidas o meglitinidas, como la repaglinida y nateglinida, son otro grupo de secretagogos de insulina. Estos agentes estimulan la secreción de insulina en la primera fase de su liberación mediante un mecanismo de acción parecido al de las sulfonilureas, puesto que se unen y bloquean a los K_{ATP} logrando despolarizar la membrana, permitiendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje y favoreciendo la liberación de insulina. Sin embargo, no inducen una liberación prolongada de insulina, es decir, producen una estimulación más rápida y corta de la secreción endógena de insulina que la que producen las sulfonilureas, con una concentración máxima que se alcanza tras una hora de su administración razón por la cual se recomienda administrar antes de cada comida para ayudar a restablecer la respuesta secretora de insulina prandial que es limitada en la DM II. De esta manera se propone que la rápida acción de las glinidas favorece un menor estrés en las células β -pancreáticas y disminuye el riesgo de hipoglucemia (Rodríguez et al., 2017; Mellado et al., 2019).

En cuanto a los efectos secundarios el más importante es la hipoglucemia, sin embargo, se acepta que el riesgo es menor que el que presentan las sulfonilureas, debido a su metabolismo hepático con una eliminación renal del 10%, y una semivida corta, por lo que requieren una dosificación más frecuente que las sulfonilureas. Además, las glinidas también se han asociado con el aumento de peso al igual que con las sulfonilureas. Así como también esta contraindicada en pacientes con insuficiencia hepática grave (Arroyo et al., 2020).

Inhibidores de alfa glucosidasa.

Este grupo de fármacos impiden el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa, integrado por acarbosa, miglitol y voglibosa, cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición competitiva de las enzimas α -glucosidasas y α -glucosidasa-hidrolasas intestinales (glucoamilasa, sucrasa, maltasa e isomaltasa) ubicadas en el borde del cepillo de los enterocitos, por lo que impiden que estas enzimas degraden disacáridos y oligosacáridos a monosacáridos antes de su absorción; lo que provoca una baja producción de insulina postprandial mediante la disminución de glucosa postprandial. Los inhibidores de α -glucosidasa disminuyen la secreción de polipéptidos inhibitorios gástricos y aumentan la secreción del péptido parecido a glucagón 1 (GLP-1). También se ha observado que reducen las concentraciones de triglicéridos, no tiene riesgo de aumento de peso o hipoglucemia y tiene una disminución sobre el efecto de la HbA1c de entre 0.5 a 1% en monoterapia (González & Ortiz, 2012).

A pesar de su relativa seguridad, se han reportado algunos efectos secundarios gastrointestinales, que podrían ser consecuencia de disacáridos y oligosacáridos en el intestino delgado incompletamente digeridos, que resulta en la fermentación bacteriana en el colon dentro de sus efectos adversos y secundarios presentan poca tolerabilidad a nivel gastrointestinal por lo que debe ser tomada con las comidas, así como también presentan baja eficacia si la dieta es pobre en carbohidratos por lo que es importante que la dieta de un paciente tratado con estos fármacos sea rica en carbohidratos complejos (Rodríguez et al., 2017).

Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas (TZD) o glitazonas, son sensibilizadores de insulina al ser agonistas selectivos del Receptor Peroxisoma Proliferador-Activado gamma (PPAR γ), receptor de la membrana nuclear que se expresa primordialmente en adipocitos. Su mecanismo de acción, junto con sus efectos metabólicos, aún no es completamente claro, sin embargo, produce efectos similares a los de la metformina ya que disminuyen la resistencia a insulina y aumentan la respuesta a insulina endógena. Así como también aumentan la expresión de genes que intervienen en la adipogénesis y la oxidación de ácidos grasos, provocando una disminución considerable de triglicéridos con elevación del colesterol-HDL. Además, interfieren con la expresión y liberación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), resistina y adiponectina logrando incrementar la sensibilidad a insulina en músculo e hígado. Las TZD al usarse en monoterapia disminuyen los niveles plasmáticos de hemoglobina glucosilada (HbA1c) en niveles parecidos a las sulfonilureas y metformina, pero sin causar hipoglucemia (Arellano et al., 2015).

El primer representante de las TZD es la troglitazona que fue retirada del mercado por la incidencia de falla hepática aguda, mientras que actualmente se encuentran disponibles en el

mercado, la pioglitazona y la rosiglitazona. De entre los efectos secundarios se encuentra la ganancia adiposa y por lo tanto el aumento de peso, aunque esta depende de la reabsorción tubular proximal de sodio, provocando como efecto secundario la presencia de edema. También es probable que haya un incremento de la incidencia de insuficiencia cardíaca con rosiglitazona, por lo que se contraindican en pacientes que presenten esta condición. Otros efectos adversos observados son a nivel óseo, una mayor incidencia de maculopatía y el aumento de riesgo en la incidencia de cáncer de vejiga con el tratamiento de TZD a largo plazo (Rodríguez et al., 2017).

Agonistas de GLP-1

El péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) es una hormona incretina indispensable en la homeostasis normal de la glucosa, la exenatida y liraglutide pertenecen a este grupo de fármacos. Los GLP-1 son producidos principalmente por los enterocitos del íleon y el colon, estos se encargan de secretar células L en el sistema gastrointestinal en respuesta a la ingesta de alimentos en donde se da la unión a los receptores GLP-1 presentes en las células beta pancreáticas. El mecanismo de acción de los agonistas de GLP-1 se basan en inducir la secreción de insulina dependiente de glucosa y de esta manera regular la liberación de glucagón lo que conlleva a inhibir la producción de glucosa hepática y aumenta la sensación de saciedad al frenar el vaciamiento gástrico junto con la inhibición de la secreción de ácido gástrico disminuyendo la hiperglucemia. Otro de sus efectos es reducir la gluconeogénesis, mejorar la sensibilidad a la glucosa y favorecer la oxidación grasa sobre la oxidación de carbohidratos, también se han asociado con la disminución de la presión arterial y concentraciones de colesterol. Los agonistas de GLP-1 logran un descenso en los niveles de HbA1c entre el 0.5 y 1%, debido a la reducción en la glucosa postprandial, así como también promueven la disminución del peso corporal (Rodríguez et al.,2017).

Entre los efectos secundarios más frecuentes se encuentran las reacciones cutáneas en el punto de inyección, el malestar gastrointestinal con síntomas de vómito, náusea o diarrea, la hipoglucemia y se han notificado casos de pancreatitis aguda (Mellado et al. ,2019).

Inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4)

Las incretinas son hormonas secretadas por el intestino en respuesta a la ingesta de alimento, cuyo efecto principal es el aumento en la secreción de insulina por la célula beta pancreática. Las incretinas más estudiadas son el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido inhibitorio gástrico. La proteína dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) es una enzima que degrada las incretinas. El mecanismo de acción de los inhibidores de la DPP-4 consiste en prevenir la degradación del GLP-1 endógeno al inhibir la enzima catabolizante DPP-4, provocando el aumento de los niveles de incretinas y a su vez la secreción de insulina, además inhiben la

secreción de glucagón y de esta manera mejorar la función de las células beta pancreáticas. Dentro de este grupo de fármacos se encuentra la sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina y linagliptina, que han mostrado una disminución de 0.6 a 0.9% en la HbA1c, además de ser bien tolerados y no causar hipoglucemia (Mellado et al.,2019).

En cuanto a sus efectos adversos, no presentan efectos notables. Sin embargo, ha habido reportes de pancreatitis aguda y artritis, mayor riesgo de enfermedad inflamatoria intestinal, riesgo de interferir con la respuesta inmune y algunas interacciones con el tracto respiratorio, pero no han podido ser adecuadamente confirmados hasta la fecha (Rodríguez et al.,2017).

Inhibidores de los cotransportadores renales de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT2)

Los inhibidores de los cotransportadores renales de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT-2) son glucósidos de aril-C que presentan baja afinidad nanomolar por los cotransportadores SGLT2 y una alta selectividad por los SGLT1. Los inhibidores de SGLT2 aprobados por la FDA son la canagliflozina, dapagliflozina y empagliflozina, la acción antihiper glucémica de los inhibidores de SGLT2 se le asigna a su efecto inhibitorio sobre la reabsorción tubular renal de glucosa en la circulación sistémica expresado en el segmento S1 del túbulo proximal en donde pueden bloquear hasta el 60% de la reabsorción de glucosa, lo que explica su resultado reductor de la glucosa en sangre con una glucosuria acompañante. Además, inhibe la proteína SGLT2 expresada en las células α pancreáticas, mejorando así la liberación de glucagón y la gluconeogénesis hepática. Los inhibidores de SGLT2 disminuyen la hemoglobina glucosilada sin aumentar el riesgo de hipoglucemia, favorecen la pérdida de peso, mejoran la hiperuricemia, los lípidos en sangre, la presión arterial, así como también mejoran los resultados renales y cardiovasculares en pacientes con DM II, principalmente en pacientes con eventos cardiovasculares previos y enfermedad renal crónica (Wright, 2021; Xu et al.,2022).

Los efectos adversos más comunes de los inhibidores de SGLT2 incluyen insuficiencia renal, también se asocia con un mayor riesgo de infecciones micóticas genitales e infecciones del tracto urinario. Además, pueden disminuir el volumen intravascular debido a la diuresis, riesgo de hipotensión ortostática y deshidratación; presenta un mayor riesgo de fractura ósea asociado con el uso de canagliflozina. Los inhibidores de SGLT2 han mostrado aumento s en los niveles de LDL-C y hematocrito que pueden ser secundarios a la hemoconcentración y se han implicado en casos raros de cetoacidosis diabética (CAD) (Donnan & Segar, 2019).

2.5 Medicina tradicional.

La medicina tradicional tiene un alto reconocimiento como un recurso primordial para la salud de millones de seres humanos, ya que representa el conocimiento milenario sobre el uso de plantas medicinales de pueblos indígenas que han resguardado, fortaleciendo y preservando su identidad. La organización mundial de la salud define a la medicina tradicional como “El cúmulo de conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizadas tanto en el mantener la salud como en la prevención, diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales.”, así mismo es catalogada como un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo, el bienestar y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Jiménez, 2017). El uso de plantas medicinales dentro de la medicina tradicional se sustenta con la presencia de los principios activos, es decir los componentes químicos que tienen un efecto farmacológico y están presentes en la materia vegetal o algún derivado de éste, dicho componente puede ser obtenido de partes aéreas o subterráneas de una planta mediante diversas técnicas como extractos y tinturas, jugos, resinas, aceites grasos y aceites esenciales (Atriano & Benito, 2021).

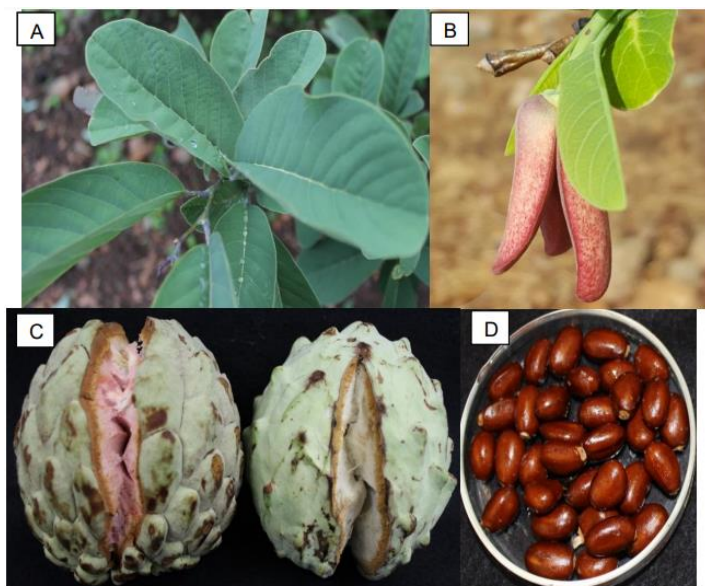
En México antes de la llegada de los españoles, los antiguos pobladores ya conocían las propiedades medicinales de diversas plantas, gracias a su desarrollo en las culturas prehispánicas. Esta práctica destaca por 3 razones: la atención a sus enfermedades, la extensa flora y la gran cantidad de grupos indígenas que conservan sus propias tradiciones, este conocimiento ha pasado tras generaciones y permanecido hasta el día de hoy como parte de la medicina tradicional mexicana y de su cultura (Castro et al, 2014). Además, en México se han reportado aproximadamente 3000 plantas medicinales, de las cuales solo un pequeño grupo ha sido estudiado para conocer sus propiedades fitoquímicas, farmacológicas, toxicológicas, junto con su farmacocinética. Debido a ello su etnofarmacología pretende documentar y salvaguardar la riqueza biológica empleada en la medicina tradicional, asimismo desarrollar sistemas sustentables de producción y uso de plantas con potencial farmacológico para el tratamiento de diversas enfermedades (Atriano & Benito, 2021).

2.6 *Annona diversifolia* Safford

La familia Annonaceae comprende 2,440 especies, en México hasta el año 2010 está representada por 14 géneros y 63 especies, entre las que destacan por su importancia económica: *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. squamosa*, *A. diversifolia*, *A. reticulata* y *A. purpurea* (Murrieta, 2020). La mayoría de las especies del género *Annona* provienen de América del sur y central, el suroeste de México, Guatemala y Salvador. *Annona diversifolia* Safford (*A. diversifolia*), se desarrolla en regiones calurosas en conjunto con la estación seca y húmeda. En México se encuentra distribuida en regiones del trópico seco de Guerrero, Michoacán, Estado de México, Chiapas, Morelos, Colima, Oaxaca y Yucatán en altitudes de 250 a 1000 metros sobre el nivel del mar (Sierra, 2019).

El árbol de *A. diversifolia*, es comúnmente conocido en México por muchos nombres locales como ilama, ilama zapote, ilamazapotl, izlama, hilama, papauce, papausa, Anona blanca, cabeza negro, cabeza de ilama y zapote de vieja (Sierra, 2019). El árbol puede alcanzar hasta los 8.5 m de altura, aunque su altura promedio es de 4 m, las raíces son de tipo pivotante, el tronco mide alrededor de 25 cm de espesor y a menudo forma ramificaciones desde el suelo formando de 3 a 6 tallos, las hojas presentan formas elípticas u oblanceoladas de 8 a 16 cm de largo con el apéndice redondeado, las flores salen del crecimiento nuevo con pétalos externos de color de 2.5 a 3 cm de longitud. El fruto mide aproximadamente 12 cm de largo y su pulpa dulce es de color blanco, rosa o rojizo con un típico aroma. Las semillas son de aspecto cilíndricas alargadas de color café, brillante, textura lisa, que alcanzan una longitud de 1.5 a 2.5 cm (Figura 2) (Murrieta, 2020).

Figura 2. Fotografía de hojas, flor, fruta y semillas de *A. diversifolia*.



Hojas (A), flor (B), fruto rosa (izquierda) y blanco (derecha) (C) y semillas (D) de *Annona diversifolia* Saff. Fuente: Sierra, 2019.

Las plantas de la familia de las Annonaceas son conocidas por ser fuentes de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas y farmacológicas. Además, se han identificado compuestos como: las acetogeninas, flavonoides, terpenoides y alcaloides derivados de isoquinolinas (Murrieta, 2020).

En estudios previos se ha demostrado la actividad anticonvulsiva y antidepresiva del sistema nervioso central del extracto etanólico de hojas de *A. diversifolia* en el que se aisló e identificó a la palmitona como el principal compuesto activo anticonvulsivo de esta especie vegetal, siendo el primer ejemplo de una cetona alifática con propiedades anticonvulsivas, el perfil farmacológico de la palmitona sugiere que actúa sobre el sistema inhibidor GABAérgico por lo que podría ser un nuevo fármaco antiepiléptico (González et al., 2001; 2006).

De acuerdo con la literatura, en otras investigaciones se ha demostrado la propiedad antinociceptivas del extracto crudo de etanol de *A. diversifolia*. A partir de estos estudios, se aislaron e identificaron a la palmitona y flavonoides, donde la palmitona mostró poseer actividad antinociceptiva, respaldando de esta manera el uso tradicional de *A. diversifolia* para el tratamiento del dolor espasmódico y artrítico (Carballo et al., 2010).

En otros estudios, se aislaron acetogeninas, la herradurina y cherimolina-2, de las semillas de *A. diversifolia*, mismas que mostraron actividad antiproliferativa in vitro e in vivo en células HeLa y SW-480 (Schlie et al., 2009).

También, se ha determinado la actividad de extractos etanólicos y acuosos de tallos y hojas de *A. muricata*, *A. diversifolia* y *A. lutescens* sobre larvas de *Anastrepha ludens*, donde los resultados señalan que los extractos de las tres especies estudiadas poseen actividad larvicida y esta es dependientes del tiempo, además de un alto contenido de acetogeninas y alcaloides fácilmente obtenibles (González et al., 2012).

Recientemente, se realizó un estudio fitoquímico biodirigido donde se reportó la actividad antihiper glucemiante del extracto etanólico, fracciones clorofórmica, acetato de etilo y acuosa residual, además se aisló el farnesol, el cuál mostró ser uno de los compuestos presentes en las hojas de *A. diversifolia*. El farnesol demostró tener actividad antihiper glucémica en ensayos agudos y subcrónicos en modelos murinos inducidos por el método de estreptozocina-nicotinamida (STID), siendo la inhibición de la enzima α -glucosidasa y/o la inhibición selectiva de SGLT1 parte de su mecanismo de acción (Calzada et al., 2019; Valdés et al., 2020).

3. Planteamiento del Problema

En el presente proyecto de investigación se propuso evaluar la actividad antihiper glucemiante de una infusión obtenida a partir de polvo de las hojas de *Annona diversifolia* Safford en ratones con DM II experimental y sanos, considerando que en la literatura, se ha reportado que el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de esta especie vegetal presenta actividad sobre los niveles de glucemia, en este sentido, el desarrollo de una tisana obtenida a partir de las hojas de *A. diversifolia* representará un avance importante en el estudio de esta especie vegetal que reforzará la información existente sobre su uso como agente antidiabético en la medicina tradicional Mexicana, además, sentará las bases para el desarrollo de un posible fitomedicamento obtenido a partir de esta especie vegetal.

4. Justificación

El panorama de esta enfermedad a nivel mundial es preocupante, ya que de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), hasta el 2021, se estimó a nivel mundial que 537 millones de adultos de entre 20-79 años tienen diabetes, esto representa el 10,5% de la población en este rango de edad. En México, 14.1 millones de personas padecen de esta enfermedad colocándonos en el séptimo lugar a nivel mundial con mayor número de casos de diabetes (IDF Diabetes Atlas, 2021). Con las estadísticas presentadas sobre los casos de diabetes, tanto a nivel mundial como nacional, podemos darnos cuenta de que estamos ante un gran problema de salud el cual ha sido atendido mediante la implementación de medidas de prevención así como el desarrollo de una gran variedad de tratamientos farmacológicos, estos últimos desafortunadamente además de los efectos terapéuticos, poseen efectos adversos y secundarios por lo que se debe analizar la situación y buscar alternativas de tratamientos con el fin de disminuir el número de estos efectos en pacientes con DM II.

En este sentido, la medicina tradicional mexicana juega un papel muy importante ya que se han reportado aproximadamente 3000 plantas medicinales, cuyas propiedades fitoquímicas, farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas han sido estudiadas en un pequeño grupo de esta diversidad de plantas medicinales. Debido a ello la etnofarmacología pretende documentar y salvaguardar la riqueza biológica empleada en la medicina tradicional mediante el uso de plantas con potencial farmacológico para el tratamiento de diversas enfermedades que aquejen a la sociedad, como lo es la DM II (Atriano & Benito, 2021). De acuerdo con esta problemática se propuso evaluar la actividad antihiper glucemiante, los efectos toxicológicos, y se realizó el estudio fitoquímico de tisanas obtenidas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford,

emulando así el uso tradicional de esta especie y demostrando mediante ensayos biológicos su actividad farmacológica, la cual justifica el uso empírico que se le da a las hojas de esta especie en la medicina tradicional mexicana, aportando de esta manera mayor información sobre el uso terapéutico de *A. diversifolia* enfocada al tratamiento de la DM II.

5. Hipótesis

La administración intragástrica de las tisanas obtenidas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford en un modelo de ratón con DM II experimental provocará efectos farmacológicos que se reflejarán en la reducción de los niveles de hiperglucemia de los animales tratados.

6. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antihiper glucemiante de tisanas obtenidas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford en un modelo de ratón con DM II experimental.

Objetivos particulares

- Obtener las tisanas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford.
- Determinar la toxicidad aguda de las tisanas obtenidas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford y la dosis letal 50 (DL 50)
- Determinar la actividad antihiper glucemiante de las tisanas de *Annona diversifolia* Safford en ratones con DM II experimental en una prueba aguda y subcrónica.
- Realizar pruebas de tolerancia oral a glucosa, sacarosa y lactosa en ratones normoglucémicos y con DM II experimental.
- Realizar el análisis fitoquímico de las tisanas de *Annona diversifolia* Safford.

7. Materiales y Métodos

7.1 Animales de laboratorio

Para los ensayos agudos, subcrónicos y pruebas de tolerancia oral a carbohidratos se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/C (25-30 g). Para la prueba de toxicidad se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c (25-30g). Los ejemplares se obtuvieron del bioterio animal del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la Ciudad de México, donde los animales fueron criados y mantenidos en condiciones estándar de laboratorio (12 h/12 h ciclos de luz/oscuridad; temperatura 22 ± 2 °C; humedad 55-80%) de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana. Además, se proporcionó alimento y agua ad libitum (NOM-062-ZOO-1999, 1999).

7.2 Material vegetal

Las hojas de *A. diversifolia* fueron recolectados en Metapa de Domilengua (14°50'00" N, 92°11'00" W) en Chiapas, México. El material vegetal fue identificado por un botánico interno (M.S. Santiago Xolapa) del Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), con un ejemplar comprobante de 16248. La muestra se limpió de cualquier impureza antes de ser aireada y secada a temperatura ambiente hasta lograr peso constante. Las muestras secas se molieron con un molinillo de laboratorio (modelo Oster).

7.3 Procedimiento de extracción de plantas

Las hojas finamente molidas de *A. diversifolia* se extrajeron por infusión acuosa, para ello se colocaron en bolsas de té grado alimenticio 0.5, 1.5 o 3.0 g de las hojas de material vegetal respectivamente, posterior a ello cada una de las bolsas se colocó en 125 mL de agua purificada de uso común previamente en estado de ebullición durante 20 min y se homogeneizó la infusión cada 5 min, al finalizar el tiempo se retira la bolsa que contenía el material vegetal en donde alcanzó una temperatura ± 58 °C con la finalidad de emular el uso tradicional. A continuación, el extracto acuoso obtenido se concentró en un evaporador rotatorio (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a 40 °C a presión reducida para obtener el extracto seco de tisanas de hojas de *A. diversifolia*. El extracto seco fue almacenado a temperatura ambiente hasta su uso.

7.4 Evaluación de la toxicidad oral aguda

Para determinar la seguridad del extracto de hojas de *A. diversifolia* se realizó la prueba del método de clase de tóxicos agudos 423 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) bajo el siguiente esquema de trabajo.

- 6 ratones BALB/c hembras sanas en ayuno de 4 horas con acceso libre al agua se asignaron aleatoriamente a los siguientes dos grupos de trabajo, integrados por 3 ratones

cada uno, el primero para control negativo administrado con el vehículo (agua purificada) y el segundo grupo para ratones administrados con el extracto acuoso de *A. diversifolia* (EAAAd). El protocolo dicta utilizar dosis únicas de 30, 300 y 3000 mg/kg para determinar la toxicidad y calcular la dosis letal 50 (DL50) comenzando con la dosis más alta (3000 mg/kg), si se observa mortalidad se continúa con la siguiente dosis hasta determinar que no exista mortalidad en los animales de estudio. La vía de administración es intragástrica con un volumen máximo de 0.5 ml para cada ratón, la elección de hembras en este modelo se hizo de acuerdo con lo indicado en el protocolo 423.

- Los ratones se mantuvieron en ayuno durante las 4 horas que duró la prueba y se observaron durante este tiempo cuidando si la dosis administrada produce letalidad y/o alteraciones de conducta, signos de efectos tóxicos como mareo, retardo o agresividad. Se llevó un registro de las condiciones generales de salud de los ratones diariamente durante un período de 14 días, al final del este tiempo realizó la eutanasia de los animales de acuerdo con la NOM-0062-ZOO-1999 y su posterior disección en donde se obtuvieron los principales órganos internos: estómago, hígado, intestinos, bazo y riñones para realizar la observación macroscópica, registro de peso con finalidad de observar si existió alguna modificación en estos órganos tras la administración de EAAAd.

7.5 Inducción de diabetes experimental

Se utilizaron ratones macho de la cepa BALB/c, el modelo utilizado para inducir DM II experimental el método de estreptozocina-nicotinamida (STID). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de recibir el tratamiento (día 0). La estreptozocina (STZ) se disolvió en una solución tampón de citrato de pH 4 fría, luego se administró un volumen de 0.5 ml a dosis de 100 mg/kg por vía intraperitoneal (IP) los días 1 y 3. La nicotinamida (NA) se disolvió en una solución salina fría y se administró un volumen de 0.5 ml a dosis de a 240 mg/kg vía IP 30 min después del tratamiento STZ solo en el día 1. Al final del tratamiento en el día 3, se usó una solución de sacarosa al 10% ad libitum durante dos días. El día 5 se retiró la solución de sacarosa y se sustituyó por agua ad libitum. Luego, 24 horas después de retirar la solución de sacarosa se recolectaron las muestras de sangre a partir de una punción en la vena caudal por punción en la parte final de la cola, la medición de los niveles de glucosa (mg/dl) se realizó por el método glucosa oxidasa, usando el glucómetro comercial (Accu-check Instant). Para fines del estudio se consideraron animales con DM II experimental aquellos que presentaran valores de glucemia que oscilaran en 200-250 mg/dL (Valdés et al., 2020).

7.6 Administración oral del extracto in vivo

Para la determinación de la actividad antihiper glucemiante de EAAAd, se utilizaron ratones que fueron inducidos a DM II experimental como se mencionó previamente y mantenían los rangos de hiper glucemia descritos. Se realizaron los ensayos agudo y subcrónico para determinar la actividad farmacológica de EAAAd como sigue:

- **Ensayo agudo**

Para determinar cómo las tisanas de hojas de *A. diversifolia* generan una disminución de la hiper glucemia, se realizaron ensayos agudos en ratones con DM II experimental.

Se administró vía intragástrica el EAAAd a dosis de 300 mg/kg. Se midió la glucemia inicial (0 h), una vez seleccionados los animales para el estudio, se formaron 5 grupos (n=6), integrados por un grupo control al cual se le administró el vehículo (agua purificada), grupo tratado con EAAAd de 0.5 g de hojas, grupo tratado con EAAAd de 1.5 g de hoja y grupo tratado con EAAAd de 3.0 g de hoja, todos a dosis de 300 mg/kg. Adicionalmente se manejó un grupo de ratones sanos que fueron tratados con el vehículo. En todos los casos, los tratamientos se solubilizaron en agua purificada y se administraron vía intragástrica en un volumen total de 0.5 ml por animal. Tras la administración se midió la glucemia a las 2 y 4 h para determinar el efecto farmacológico post administración de EAAAd.

- **Ensayo subcrónico in vivo**

El ensayo subcrónico se realizó en ratones con DM II experimental y sanos. Una vez generado el modelo de diabetes experimental, se seleccionaron los animales y se formaron 4 grupos (n=6), integrados por un grupo control administrados con el vehículo (agua purificada), un grupo tratado con la tisana con mejor actividad en las pruebas agudas, EAAAd de 1.5 g de hoja a dosis de 300 mg/kg, un grupo tratado con el control farmacológico acarbossa a dosis de 50 mg / kg y un grupo control sano que fue tratado con el vehículo (agua purificada).

Los animales de cada grupo fueron administrados vía intragástrica diariamente (cada ~24 h) los tratamientos previamente mencionados en un volumen total de 0.5 ml por animal. Se llevó un registro de los niveles de glucemia al inicio (T0) y semanalmente, así como también se midió el porcentaje de hemoglobina glicada (%HbA1c) y perfil lipídico en las semanas 0, 4 y 6. Al término de la prueba se realizó la eutanasia a los ratones de acuerdo con la NOM-0062-ZOO-1999. El sacrificio se realizó mediante dislocación cervical y posterior a ello se realizó la disección en donde se obtuvieron los órganos: estómago, hígado, intestinos, bazo y riñones los cuales fueron observados macroscópicamente y se registró el peso de estos con la finalidad de determinar si la administración de EAAAd generó algún daño en los órganos estudiados.

7.7 Pruebas orales de tolerancia a diversos carbohidratos (glucosa, sacarosa y lactosa)

De acuerdo con estudios previos realizados en el extracto etanólico de hojas de *A. diversifolia* (EEAd), la posible actividad inhibidora de la α -glucosidasa se evaluó mediante pruebas de tolerancia oral a la glucosa (TOG), sacarosa (TOS) y lactosa (TOL) (Valdés et al, 2019). Dicho lo anterior se propuso evaluar el posible mecanismo de la actividad antihiper glucemiante del extracto acuoso de *A. diversifolia* para identificar parte del probable mecanismo de acción por el cual la planta ejerce su actividad, como podría ser la inhibición de las α -glucosidasas o el mecanismo de transporte de glucosa por mencionar algunos mecanismos que se realizaron en estudios similares con otras especies de plantas de diversas familias como *Salvia amarissima* o *Annona cherimola*, que han sido estudiados como agentes antihiper glucémicos (Solares et al., 2021; Martínez et al., 2021).

Prueba de Tolerancia Oral a Glucosa (TOG).

La prueba oral de tolerancia a la glucosa (TOG) se realizó en ratones macho sanos de la cepa BALB/C con un periodo de 3 h de ayuno. Se formaron seis grupos (n = 6).

- 1) Grupo tratado con el vehículo (agua purificada).
- 2) Grupo tratado con EEAd (300 mg / kg)
- 3) Grupo tratado con el extracto etanólico de *Annona diversifolia* (EEAd) a dosis de 300 mg / kg.
- 4) Grupo tratado con el fármaco control canagliflozina (50 mg / kg)

Se midieron las glucemias iniciales (0 h), se administraron los tratamientos y se dejó transcurrir 30 min, posteriormente se administró una solución de glucosa (1,5 g/kg). Se midió la glucemia a las 0.5, 1, 2, 3 y 4 h después de la carga del carbohidrato para determinar el efecto pico postprandial de glucosa y si existía o no inhibición de este con los tratamientos administrados.

Prueba de Tolerancia Oral a Sacarosa (TOS) y Lactosa (TOL).

La prueba oral de tolerancia a sacarosa (TOS) y lactosa (TOL) se realizaron bajo las mismas condiciones que en la prueba de TOG, para el caso de TOS se administró una solución de sacarosa (3,0 g/kg), mientras que para la prueba de TOL se administró una solución de Lactosa (4,0 g/kg). Además, para ambas pruebas TOS y TOL, acarbosa (50 mg / kg) actuó como fármaco control.

Para las pruebas de TOG, TOS y TOL del extracto acuoso de *A. diversifolia* en ratones DMII experimental se utilizó el mismo esquema de trabajo antes descrito, pero se manejó en

animales diabéticos experimentales con niveles de glucemia de 200-300 mg/dL inicial (T0) y grupos de trabajo 1, 2 y 4 para determinar su actividad.

7.8 Análisis fitoquímico de *Annona diversifolia*

Para conocer la composición fitoquímica de EAd, se realizaron ensayos de cromatografía en capa fina analítica utilizando como fase estacionaria (sílica gel) y fase móvil (diversos solventes) utilizando estándares comerciales de los sesquiterpenos farnesal y farnesol, los cuales ya han sido reportados como metabolitos presentes en *A. diversifolia* que poseen actividad antihiper glucemiante (Valdés et al., 2020). También, como referencia se utilizó una muestra de extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de *A. diversifolia* (EAd). Se utilizaron dos sistemas de elución, diclorometano 100% y hexano:acetato de etilo 80:20, las cromatoplasas se revelaron con ácido sulfúrico al 10%, para identificar la presencia de terpenoides en el EAd y EAd.

Además, las muestras y estándares fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)-detección de matriz de diodos (DAD) (Waters Agilent). El análisis se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida HPLC- DAD Waters 2795 acoplado con un detector de matriz de fotodiodos Waters 996 y una estación de trabajo analítica Millennium 3.1 equipada con una columna analítica C18 (Waters) con dimensiones de 250 mm x 4,6 mm y tamaño de partícula de 5 µm (Spherisorb S50D52, Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU). Para el análisis se utilizaron 5 mg de EAd y se disolvió en 4 mL de ácido acético al 2% más 1 mL de acetonitrilo. Se inyectó un volumen de muestra de 10 µL de esa solución y para la elución se utilizó un sistema compuesto por una fase móvil binaria de disolvente ácido acético al 2% en agua (A) y acetonitrilo al 100% (B). Además, se trabajaron dos condiciones de funcionamiento del cromatógrafo uno para la identificación de flavonoides y el segundo para la identificación de terpenoides, para ello se programó el equipo con los siguientes gradientes:

Tabla 2. Condiciones de funcionamiento para flavonoides.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B	Curva
	0.80	80	20	
1	0.80	80	20	6
8	0.80	40	60	6
33	0.80	30	70	6
25	0.80	80	20	6

Para la identificación de flavonoides, la detección se realizó a una longitud de onda (λ) de 254 nm a 25 °C y un tiempo total de elución de 25 min; al final, se graficaron los datos recolectados. La presencia de sustancias en el EAAAd se confirmó comparando los tiempos de retención y los espectros UV obtenidos por EAAAd con cada uno de los estándares.

Tabla 3. Condiciones de funcionamiento para Terpenoides.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B	Curva
	0.80	80	20	
2	0.80	80	20	6
16	0.80	80	70	6
28	0.80	30	70	6
30	0.80	80	20	6

Para la identificación de terpenoides, la detección se realizó a una longitud de onda (λ) de 238 nm a 25 °C y un tiempo total de elución de 30 min; al final se graficaron los datos recolectados. La presencia de sustancias en el EAAAd se confirmó comparando los tiempos de retención y los espectros UV obtenidos por EAAAd con EEAd y cada uno de los estándares.

7.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico y la construcción de las gráficas se realizó con el software GraphPad Prims versión 8.0, los datos se expresan como la media (\pm) el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba post hoc de Bonferroni con un nivel de confianza del 95%.

8. Resultados

8.1 Obtención de las tisanas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford.

Se llevó a cabo el proceso de extracción mediante infusión de las hojas en tres cantidades distintas (0.5, 1.5 y 3g) de material vegetal. El rendimiento de la extracción de las tisanas a diferentes concentraciones se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Promedio del rendimiento obtenido en el proceso de extracción a partir de 0.5, 1.5 y 3 g de hojas de *A. diversifolia*.

Concentración de infusión	Peso (g)	Rendimiento (%)
0.5 g	0.04612±0.0058	9.22±1.17
1.5 g	0.2535±0.0363	16.90±2.42
3.0 g	0.05785±0.0039	1.92±0.12

8.2 Determinación de la toxicidad aguda de las tisanas obtenidas a partir de las hojas de *Annona diversifolia* Safford y la dosis letal 50 (DL 50).

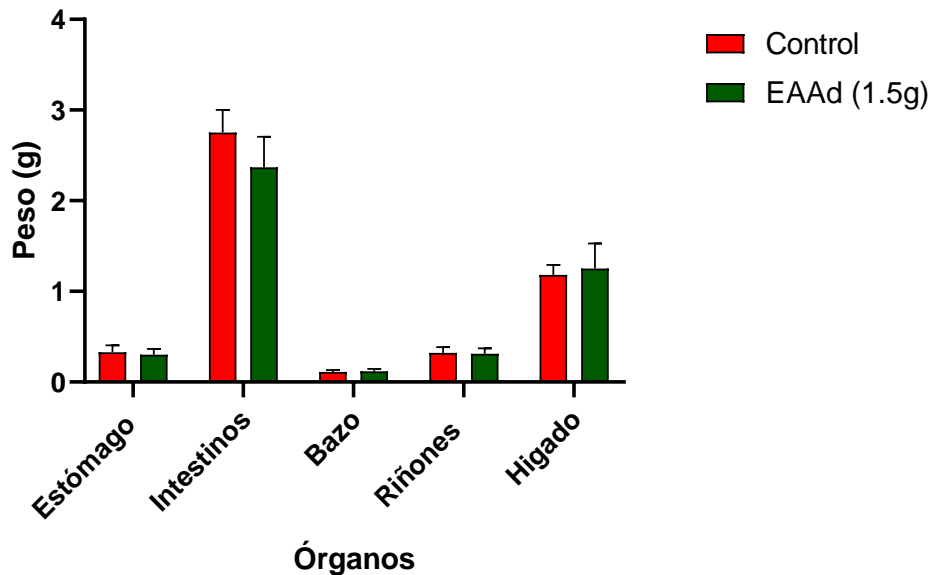
Tras la administración del extracto acuoso de *A. diversifolia* (EAAAd), de 1.5 g de hojas, no se observó letalidad o alteraciones de conducta en los modelos animales a una dosis 2300 mg/kg, con los datos obtenidos se calculó una dosis letal 50 (DL50) mayor a 2300 mg/kg que cae dentro de la categoría 5 de conformidad con la directriz n.º 423 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) lo cual indica ser de uso seguro y no tóxico. Al llevar a cabo la eutanasia de los animales y posterior disección, no se observó alguna alteración macroscópica ni variación en el peso de los órganos al compararlos con el control negativo (Tabla 5 y Gráfica 1).

Tabla 5. Peso promedio de órganos de animales en prueba de toxicidad oral aguda.

Grupo	Órgano				
	Estómago (g)	Intestinos (g)	Riñones (g)	Bazo (g)	Hígado (g)
Control	0.32±0.04	2.75±0.14	0.32±0.03	0.11±0.01	1.18±0.06
EAAAd	0.30±0.03	2.36±0.19	0.31±0.03	0.11±0.01	1.25±0.15

Resultados representados como el promedio de los pesos ± S.E.M. n=3.

Evaluación de Órganos en prueba TOA



Gráfica 1. Comparación del peso de los órganos de animales tratados con EAAAd 1.5 g a dosis de 2400 mg/kg y grupo control (Vehículo) en la prueba de toxicidad oral aguda. Valores representados en la gráfica como el promedio de los pesos \pm S.E.M. $n=3$, $p \leq 0.05$, análisis por ANOVA de 1 vía.

Los resultados de la prueba de toxicidad oral aguda nos sugieren que existe un margen de seguridad muy amplio de dosis para utilizar el EAAAd, el cual va de 0 a 2400 mg/kg. Una vez determinada la toxicidad de EAAAd, se procedió a evaluar su actividad antidiabética en el modelo *in vivo*.

8.3 Determinación de la actividad antihiper glucemiante de las tisanas de *Annona diversifolia* Safford en ratones con DM II experimental en una prueba aguda y subcrónica.

Se evaluó la actividad antihiper glucemiante aguda para determinar el potencial efecto antihiper glucémico de las tisanas de *A. diversifolia* con diferentes cantidades de polvo de hoja (0.5, 1.5 y 3.0 g) en ratones con DM II experimental.

Ensayo agudo.

En esta evaluación se administraron las infusiones de *A. diversifolia* 0.5, 1.5 y 3.0 g de materia vegetal a dosis de 300 mg/kg. Tras la administración se registraron los niveles de glucosa a las 2 y 4 horas. El efecto antihiper glucemiante del extracto acuoso de *A. diversifolia* fue comparado

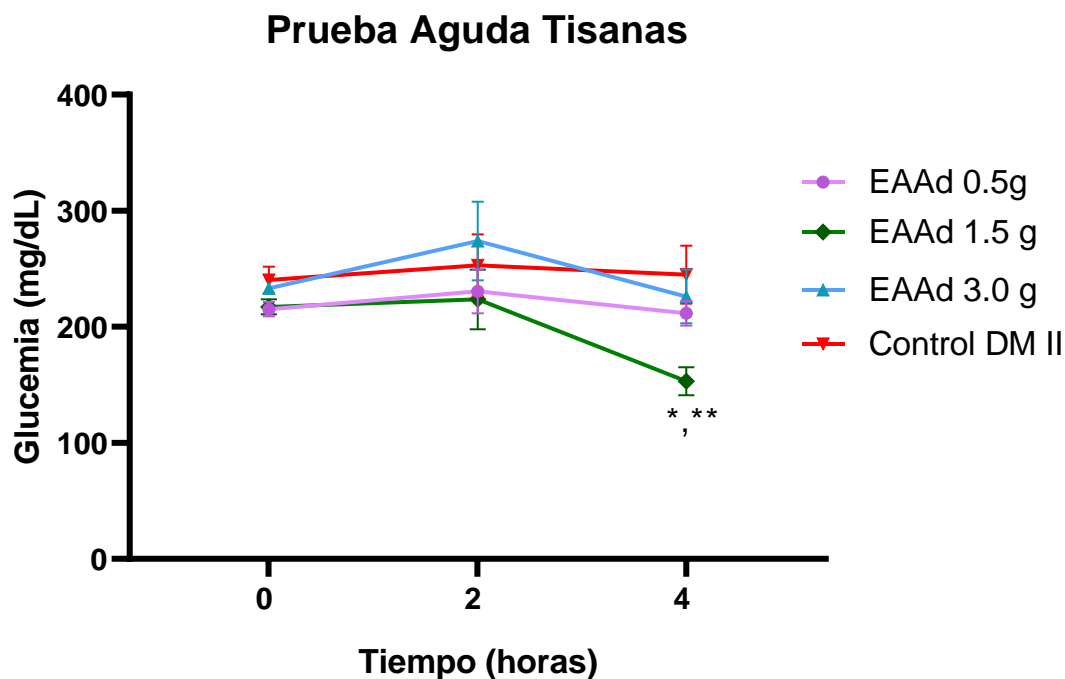
con un control DM II experimental, así como de un control farmacológico el cual fue acarbosa a dosis de 50 mg/kg.

Se determinó que la tisana EAAAd-1.5 g redujo significativamente los niveles de hiperglucemia a las 4 horas, los valores obtenidos fueron significativos en comparación a los valores iniciales del grupo y comparándolos con el grupo Control DM II a las 4 h. Respecto a las otras 2 tisanas, se observa una tendencia a la baja en los niveles de glucemia con respecto al control DM II, pero sin diferencia estadísticamente significativa (Tabla 6, Gráfica 2).

Tabla 6. Valores de glucemia obtenidos en prueba aguda.

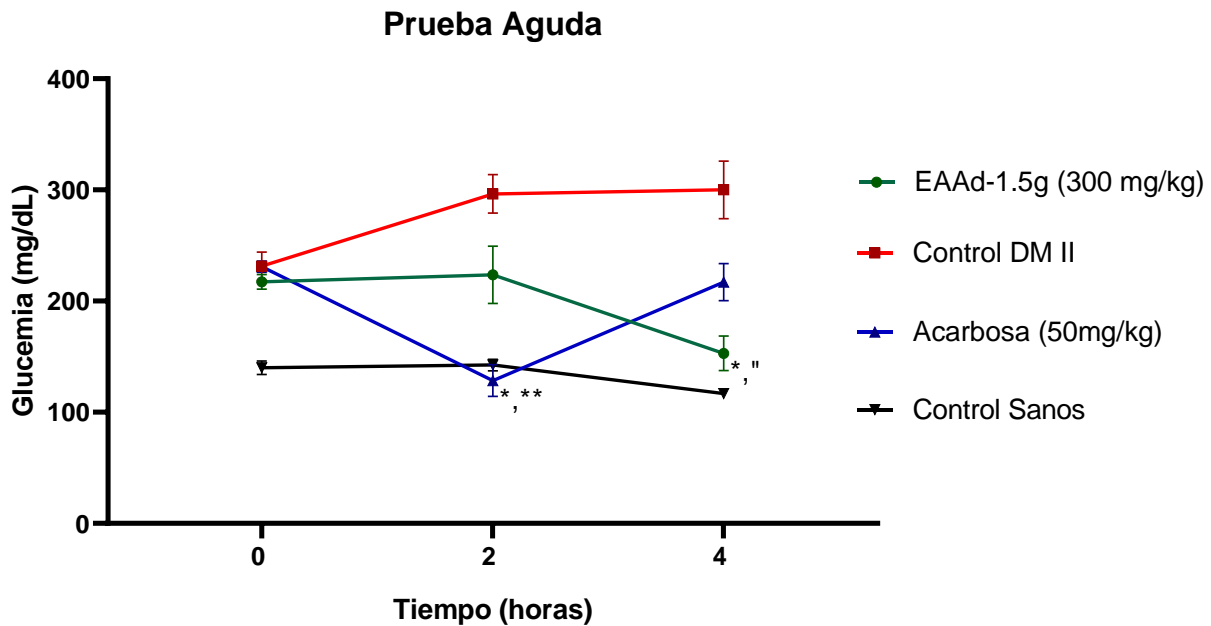
Grupo	Glucemia (mg/dL)		
	0 h	2 h	4 h
EAAAd 0.5g	215.2±6.0	230.6±19.0	201.6±4.6
EAAAd 1.5g	207.0±1.7	213.8±15.4	190.4±11.5 ^{*,**}
EAAAd 3.0g	233.2±2.7	252.0±25.9	226.0±23.1
Control DM II	232.2±9.8	228.6±13.0	275.8±24.3

Resultados representados en la tabla como el promedio de las glucemias ± S.E.M. a las 0, 2 y 4 h de animales tratados con tisanas de 0.5 g, 1.5 g y 3.0 g de material vegetal a dosis de 300mg/kg y grupo control DM II en los ensayos agudos. *p≤0.05 vs. 0 h ; **p≤0.05 vs. 4 h Control DM II.



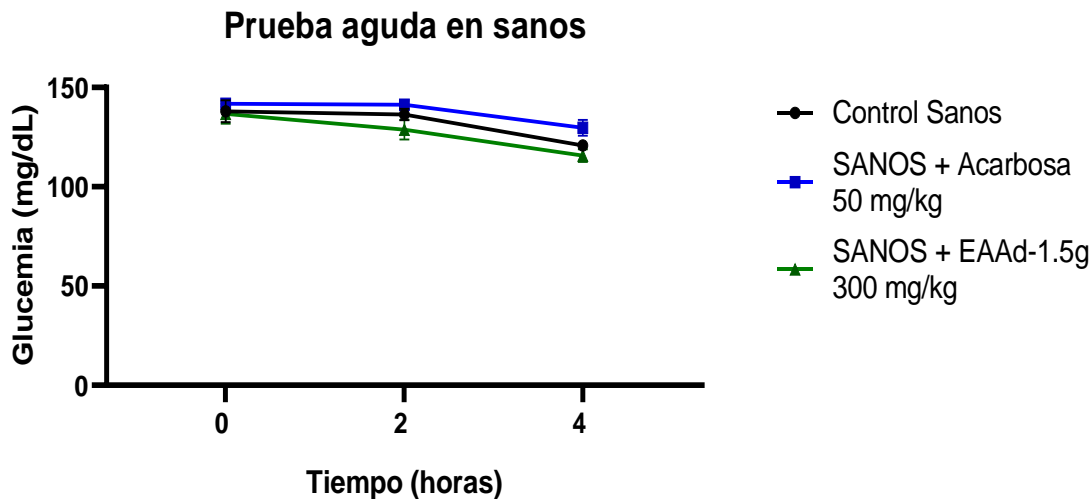
Gráfica 2. Comparación de la glucemia de animales diabéticos experimentales tratados con EAAAd 0.5 g, 1.5 g y 3.0 g y control DM II 0, 2 y 4 h en prueba aguda. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias ± S.E.M. n=6, *p≤0.05 vs. 0 h; **p≤0.05 vs. 4 h Control DM II.

El efecto farmacológico de EAd-1.5 g se comparó en un ensayo agudo con el control farmacológico acarbosa 50 mg/kg. Los resultados obtenidos demostraron una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control DM II vs el grupo acarbosa a las 2 h. En comparación, el grupo tratado con EAd-1.5 g mostró una tendencia a la baja manteniendo el control con valores significativos a las 4 h de la prueba en comparación con el grupo control DM II a las 4 h (Gráfica 3).



Gráfica 3. Valores de glucemia a las 0, 2 y 4 h de animales diabéticos tratados con EAd 1.5 g 300 mg/kg, acarbosa (50 mg/kg) y animales el control DM II y sano. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6, * $p \leq 0.05$ vs 0 h; ** $p \leq 0.05$ vs 2h Control DM II; " $p \leq 0.05$ vs Control DM II 4 h.

Una vez determinada la actividad antihiper glucemiante de las tisanas en modelos murinos con DM II experimental, se evaluó su actividad en ratones BALB/c sanos, utilizando como control farmacológico (acarbosa 50 mg/kg) y un grupo control sano. La administración de los tratamientos no generó alteraciones significativas en los niveles de glucemia del grupo control sano, el grupo acarbosa y el grupo EAd-1.5 g. Los resultados sugieren que la tisana obtenida a partir de 1.5 g de hojas de *A. diversifolia* no tiene un efecto hipoglucemiante y que al igual que la acarbosa actúa como un antihiper glucemiante (Gráfica 4).



Gráfica 4. Valores de glucemia de animales sanos tratados con EAd 1.5 g (300mg/kg), acarbosa (50mg/kg) y grupo control sano. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6.

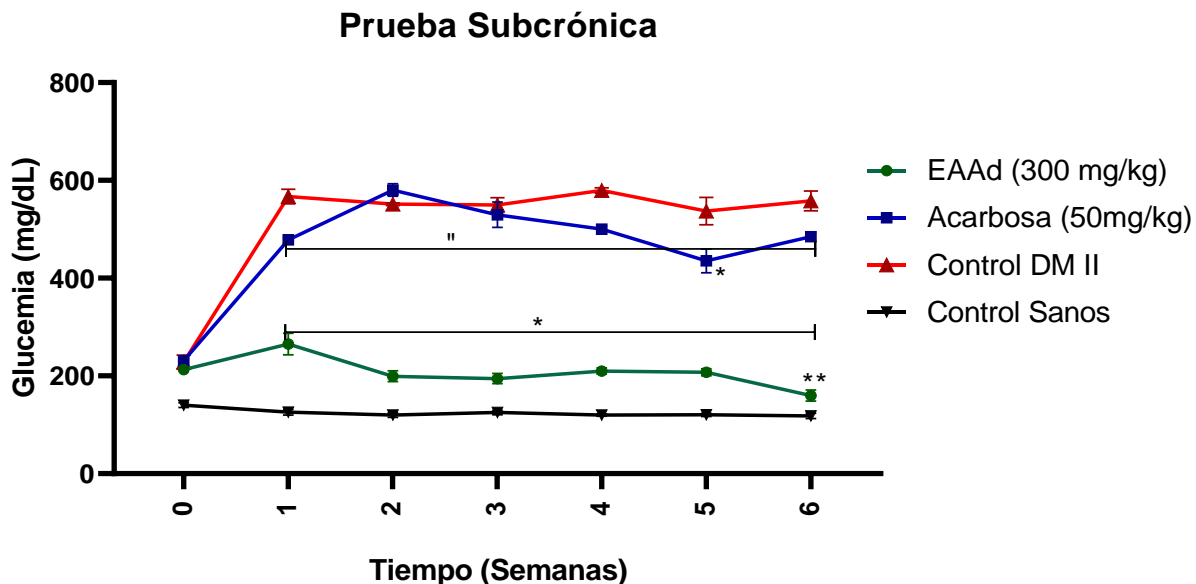
A partir de los resultados obtenidos, se determinó que la tisana elaborada a partir de 1.5 g del material vegetal a dosis de 300 mg/kg es la que posee mejor actividad reduciendo eficazmente los niveles de hiperglucemia, además, los resultados indican que el grupo tratado con el EAd (1.5g) y acarbosa poseen una tendencia a la baja con probabilidad de alcanzar la normoglucemia, sin embargo, el efecto observado fue tras la administración de una sola dosis, por lo tanto se decidió continuar con el tratamiento de EAd (1.5 g) en una prueba subcrónica durante 42 días administrando una dosis de 300 mg/kg de dicho tratamiento.

Ensayo subcrónico.

Con los resultados obtenidos en los ensayos agudos, se propuso evaluar el EAd subcrónicamente con el objetivo de determinar si la administración diaria durante un periodo de 42 días generaría la reducción adecuada de la hiperglucemia y llevaría a los animales a la normoglucemia.

Para la prueba se utilizó el EAd con mejor efectividad (1.5 g) a dosis de 300 mg/kg y como fármaco control acarbosa. La administración de EAd generó una disminución significativa de la hiperglucemia a partir de la primera semana de tratamiento, este efecto se mantuvo a lo largo de los 42 días de prueba, cabe destacar que se observa que los valores a partir de la semana 2 son cercanos a los de un ratón normoglucémico (Gráfica 5). Respecto al fármaco control se observó que, si existió una disminución de la hiperglucemia al ser comparado con el

control DM II, sin embargo, los animales administrados con este tratamiento continuaron presentando valores hiperglucémicos a lo largo de la prueba sin lograr un buen control de este parámetro (Gráfica 5).



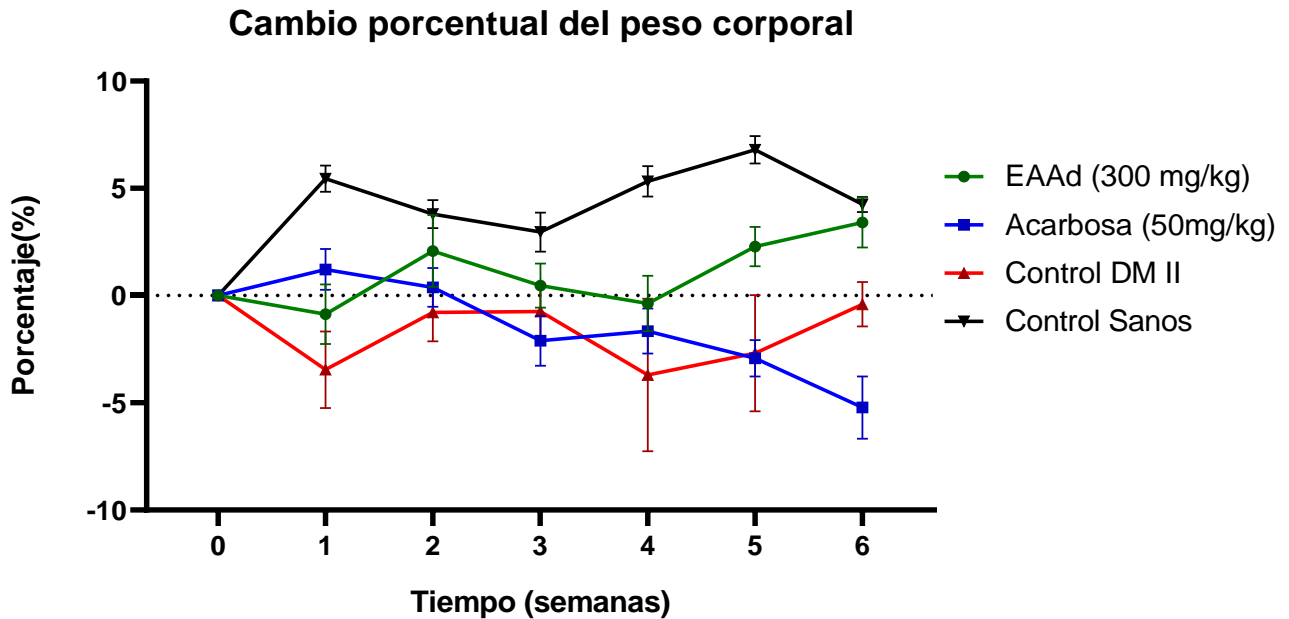
Gráfica 5. Valores de glucemia de animales con DM II experimental tratados con EAAAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), control DM II y control sano en prueba subcrónica, mediciones semanales durante 42 días. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6, *p \leq 0.05 vs Control DMII; **p \leq 0.05 vs Semana 0 EAAAd; "p \leq 0.05 vs Semana 0 acarbosa.

Además de los niveles de glucemia se consideraron parámetros como el peso, dichas mediciones se realizaron semanalmente durante la prueba. El cambio porcentual en el peso corporal se calculó utilizando la siguiente fórmula (Martínez et al., 2021):

$$\text{Cambio porcentual del peso corporal} = 100 \times \left(\frac{\text{Peso}_n - \text{Peso } t_0}{\text{Peso } t_0} \right)$$

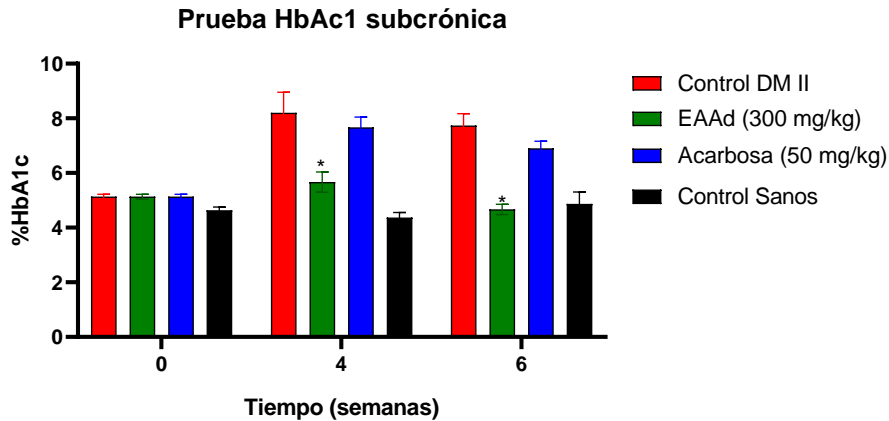
En donde: $\text{Peso } t_0$ corresponde a la medición del primer día, mientras que Peso_n a las mediciones semanales.

En esta evaluación no existió alguna diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos de trabajo (Gráfica 6).



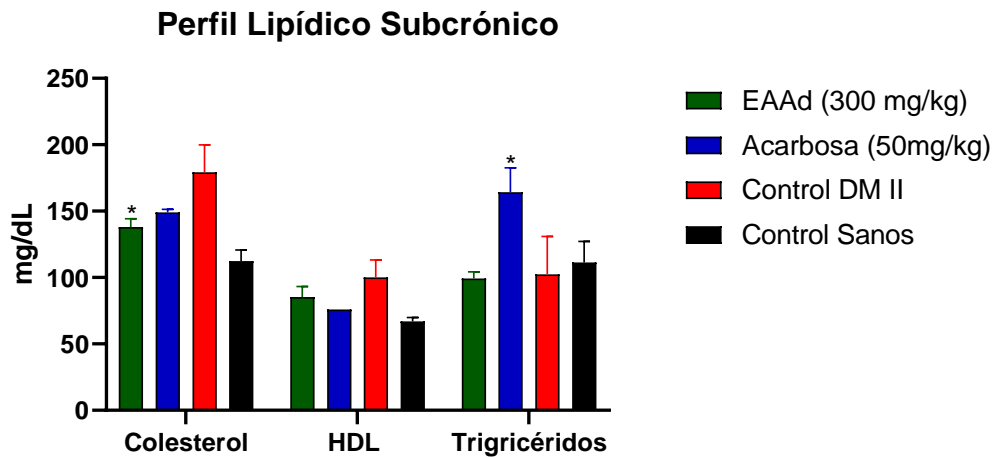
Gráfica 6. Comparación del porcentaje promedio de cambio en el peso corporal de los grupos experimentales en el ensayo subcrónico: animales diabéticos experimentales tratados con EAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), control DM II y control sano. Medición semanal durante 42 días. Cada punto representado en la gráfica indica el valor promedio de cada grupo \pm S.E.M. $n=6$, $p \leq 0.05$, análisis por ANOVA de 1 vía.

Adicionalmente se midió el porcentaje de hemoglobina glicada (%HbA1c) y el perfil lipídico de los animales, con el objetivo de establecer si el tratamiento subcrónico con EAd generaba alguna mejoría sobre los parámetros. Se observó una disminución significativa en los niveles del %HbA1c en los animales tratados con EAd (1.5 g), llevando a valores cercanos a los de un ratón normoglucémico desde la semana 4, alcanzando valores normales de %HbA1c en la semana 6 (Gráfica 7). En cuanto al control DM II, se observa la tendencia al alza de la hiperglucemia que se refleja en un incremento significativo del %HbA1c, el mismo comportamiento se observó en el grupo que se trató con acarbosa, es decir, no se logró un buen control del estado hiperglucémico de los animales tratados (Gráfica 7).



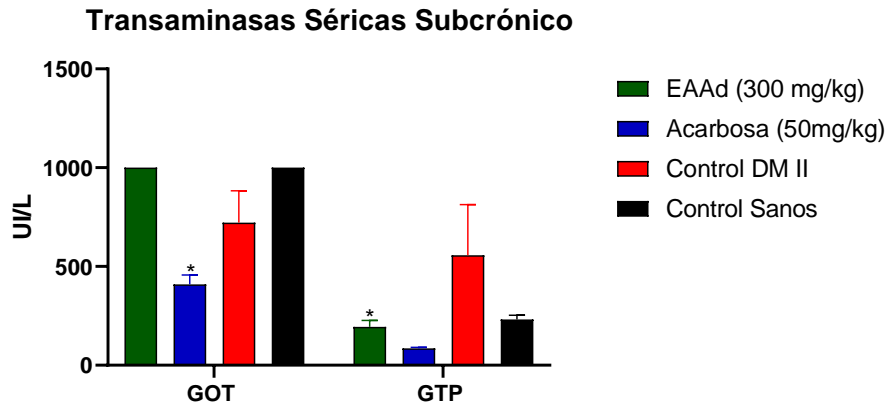
Gráfica 7. Comparación del %HbA1c de animales con DM II experimental tratados con EAAAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), control DM II y control sano en el ensayo subcrónico, mediciones a las 0, 4 y 6 semanas. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6, * $p \leq 0.05$ vs. control DM II.

Respecto al perfil lipídico, el grupo tratado con EAAAd (1.5 g) a dosis de 300 mg/kg mostró una disminución de los niveles de colesterol en comparación con el control de DM II, esta disminución resultó más evidente que la observada por el grupo tratado con acarbosa (Gráfica 8).



Gráfica 8. Comparación del perfil lipídico (colesterol, HDL y triglicéridos) en animales con DM II experimental tratados con EAAAd 1.5g (300mg/kg), acarbosa (50mg/kg), control DM II y control sano de manera subcrónica con mediciones a las 6 semanas. Resultados representados en la gráfica como el promedio \pm S.E.M. n=6, * $p \leq 0.05$ vs. control DM II.

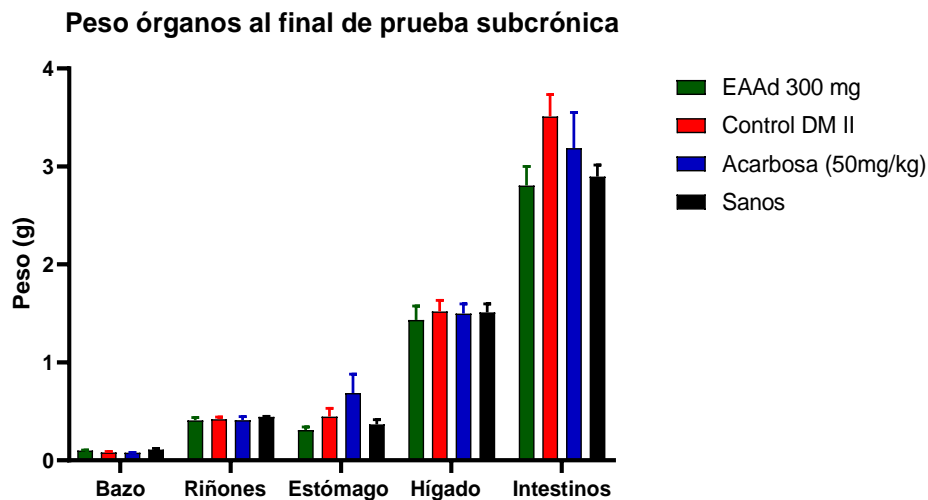
Por último, respecto a las transaminasas séricas, el grupo tratado con EAd (1.5 g) a dosis de 300 mg/kg mostró una disminución de los niveles de GTP y a su vez un aumento de GOT en comparación con el control de DM II, esta disminución resultó más evidente que la observada por el grupo tratado con acarbosa al final de la prueba (Gráfica 9).



Gráfica 9. Comparación de transaminasas séricas (GOT y GTP) en animales con DM II experimental tratados con EAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), control DM II y control sano de manera subcrónica con mediciones a las 6 semanas. Resultados representados en la gráfica como el promedio \pm S.E.M. n=6, * $p \leq 0.05$ vs. Control DMII.

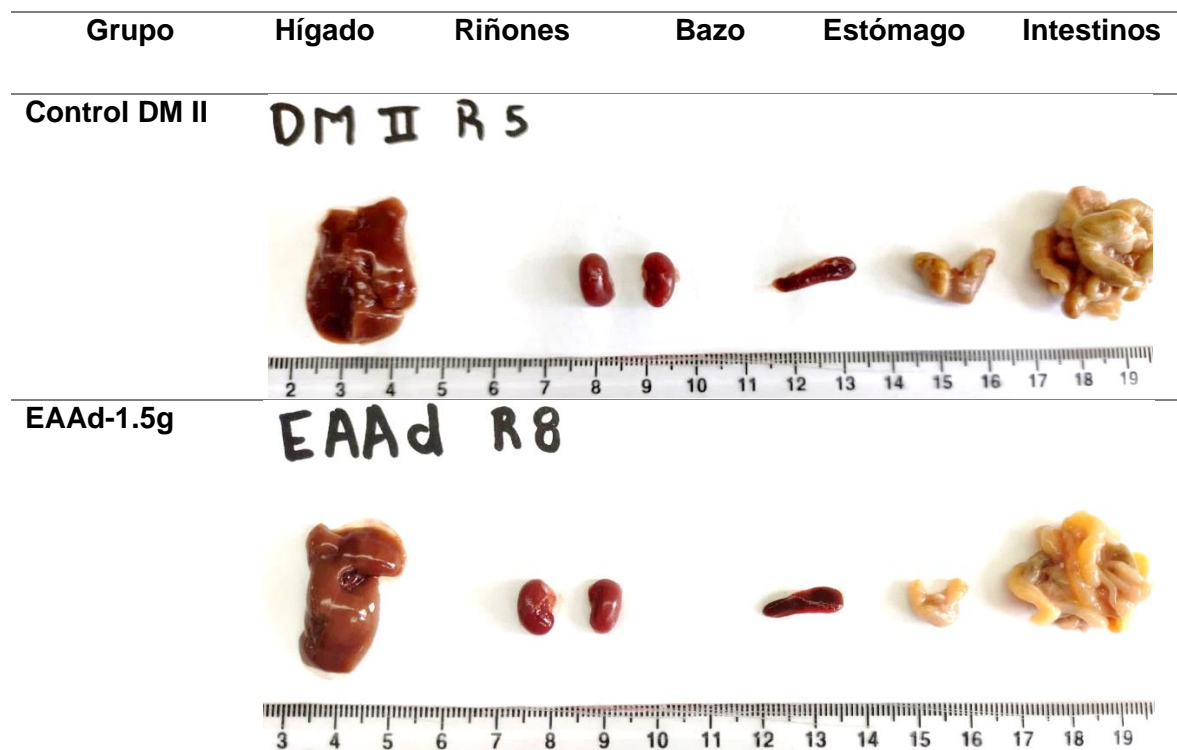
Análisis de pesos de órganos al final de la prueba subcrónica

Al concluir con la prueba subcrónica 42 días después de la administración diaria del EAd-1.5 g a dosis de 300 mg/kg y medir los parámetros descritos en la metodología, se realiza la eutanasia a los ratones después del tratamiento de acuerdo con la NOM-0062-ZOO-1999, para ello se practica la disección en donde se extrajeron los órganos: estómago, hígado, intestinos; bazo, y riñones en los cuales no se observó alguna alteración macroscópica, ni variación en los pesos de estos órganos comparados con el control DM II experimental (Gráfica 10, Tabla 7).



Gráfica 10. Comparación del peso de los órganos (g) de los grupos experimentales en el ensayo subcrónico: animales diabéticos experimentales tratados con EAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), control DM II y control sano. Medición semanal durante 42 días. Resultados representados en la gráfica como el promedio de los pesos \pm S.E.M. n=6, $p \leq 0.05$, análisis por ANOVA de 1 vía.

Tabla 7. Fotografías de órganos obtenidos al final de la prueba subcrónica.



Acarbosa

Acarbosa R9



Sano

Sano R4

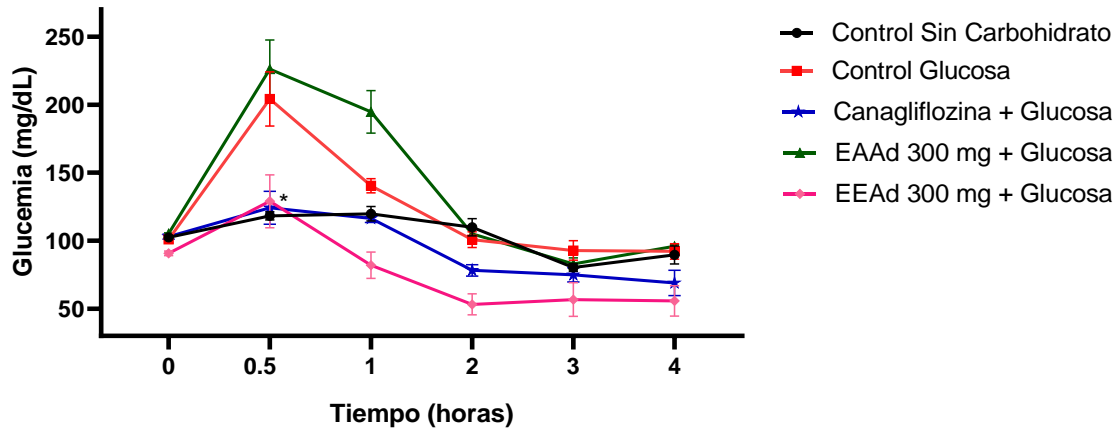


Resultados presentados en la tabla en fotografías de órganos (hígado, riñones, bazo, estómago e intestinos) de cada uno de los grupos tratados (EAd-1.5 g, acarbosa, control DM II y control sano) obtenidos mediante la eutanasia, al final de la prueba subcrónica.

8.4 Realización de pruebas de tolerancia oral a glucosa, sacarosa y lactosa en ratones normoglucémicos y con DM II experimental.

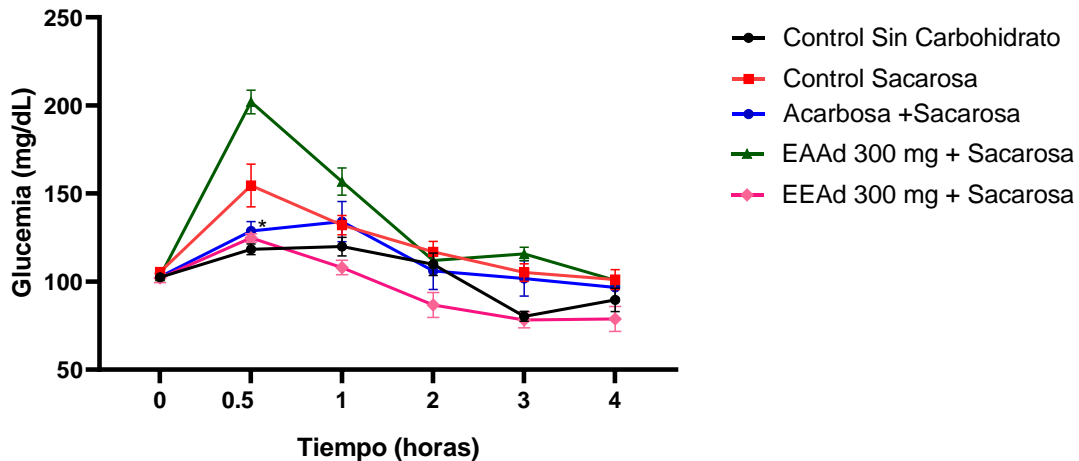
Los resultados de las pruebas de tolerancia oral a glucosa, sacarosa y lactosa en ratones normoglucémicos fueron: en la prueba de TOG después de la administración de cada uno de los tratamientos, el EAd y Canagliflozina mostraron una reducción significativa del pico posprandial a las 0.5 h con respecto grupo glucosa, mientras que el EAd-1.5 g no mostró reducción del pico posprandial al mismo tiempo (Gráfica 11). En la prueba de TOS, los grupos tratados con EAd y acarbosa mostraron una reducción significativa del pico posprandial a las 0.5 h con respecto grupo sacarosa, mientras que el EAd-1.5 g no mostró reducción (Gráfica 12). Mientras que, en la prueba de TOL, los grupos tratados con EAd-1.5g y EAd mostraron una reducción significativa del pico posprandial a las 1.0 h con respecto al grupo lactosa, el control farmacológico acarbosa no mostró reducción (Gráfica 13).

TO a Glucosa en normoglucémicos



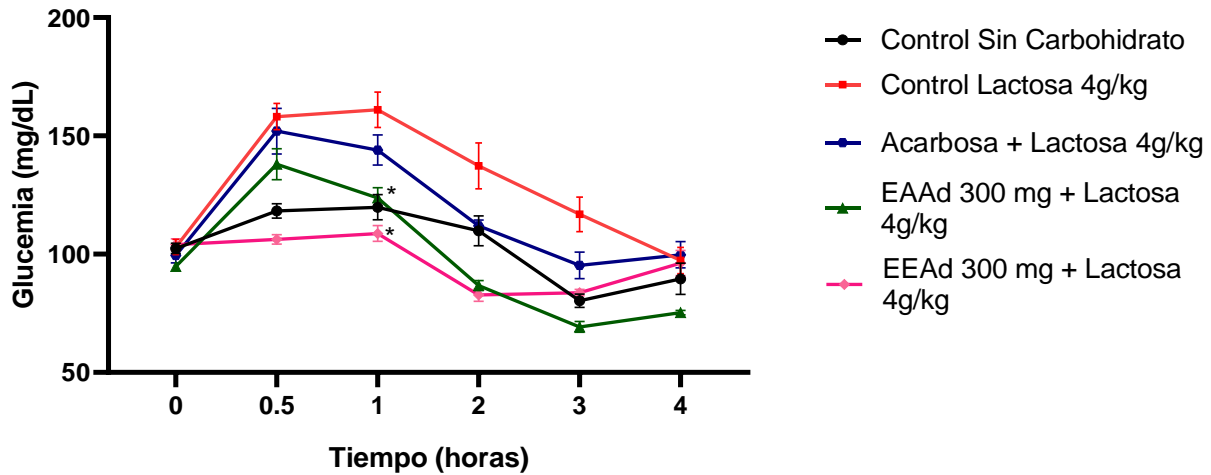
Gráfica 11. Comparación de glucemia de animales sanos tratados con EAd 1.5 g (300 mg/kg), canagliflozina (50 mg/kg), EEAd, control con carbohidrato glucosa (1.5 g/kg) y control sin carbohidrato. Mediciones a las 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6, *p<0.05 vs. 0.5 h Control de Glucosa.

TO a Sacarosa en normoglucémicos



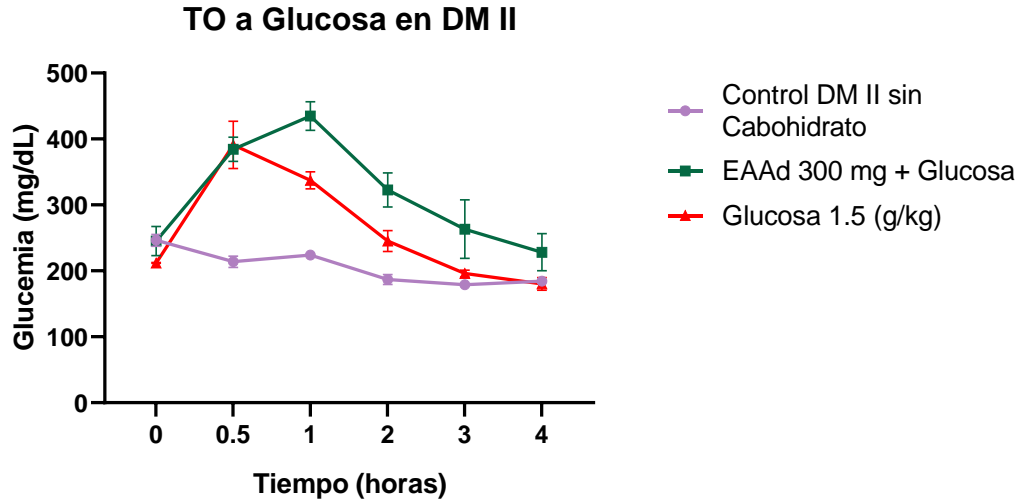
Gráfica 12. Comparación de glucemia de animales sanos tratados con EAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), EEAd, control con carbohidrato sacarosa (3.0 g/kg) y control sin carbohidrato. Mediciones a las 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6, *p<0.05 vs. 0.5 h Control de sacarosa.

TO a Lactosa en normoglumémicos

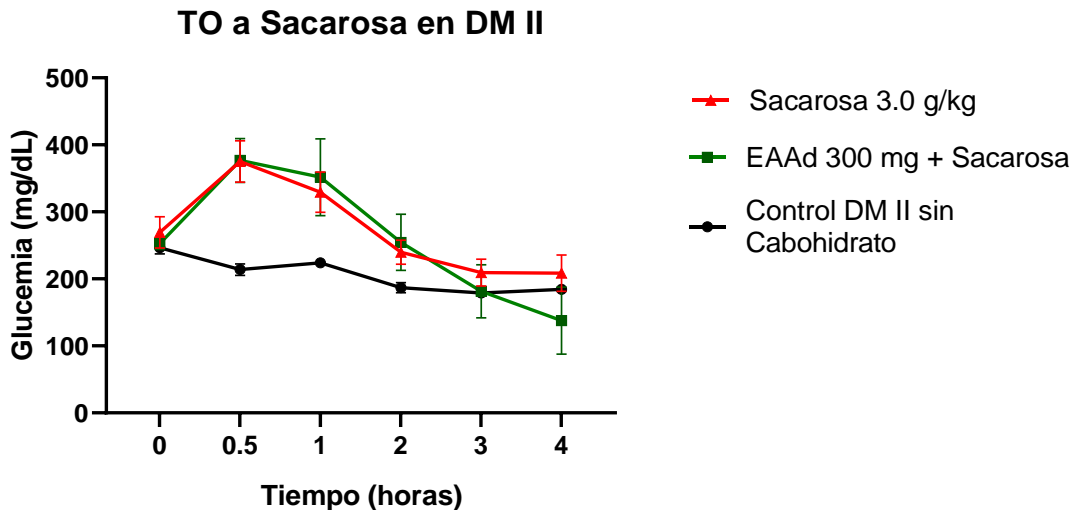


Gráfica 13. Comparación de glucemia de animales sanos tratados con EAAAd 1.5 g (300 mg/kg), acarbosa (50 mg/kg), EEAd, control con carbohidrato lactosa (4.0 g/kg) y control sin carbohidrato. Mediciones a las 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. n=6, * $p \leq 0.05$ vs. 1 h Control de lactosa.

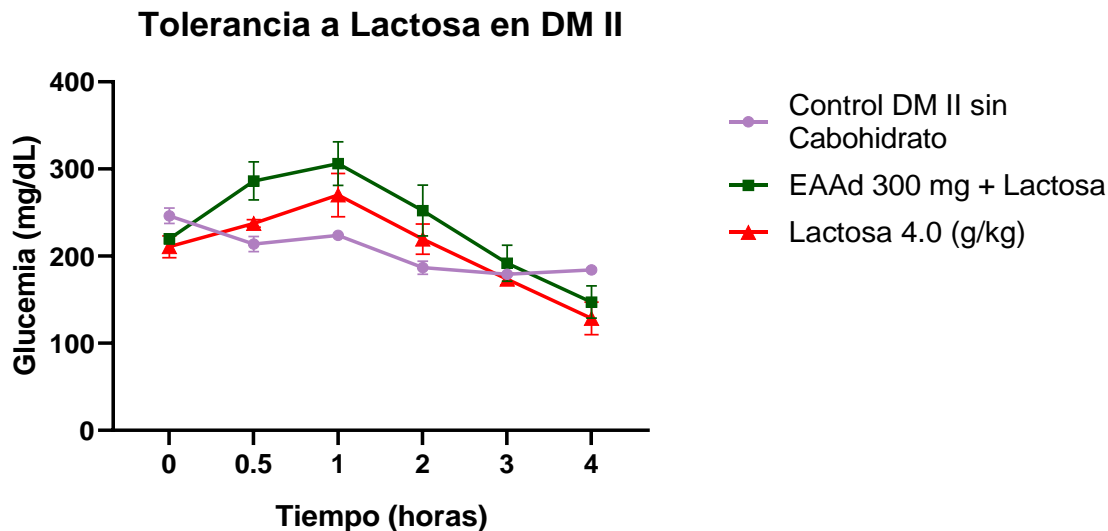
Los resultados de las pruebas de tolerancia oral a glucosa, sacarosa y lactosa en ratones DM II experimentales mostraron: en la prueba de TOG el EAAAd-1.5 g no mostró una reducción significativa del pico posprandial a las 0.5 h con respecto grupo glucosa (Gráfica 14). Para el caso la prueba de TOS los resultados fueron muy similares que la prueba de TOG, ya que el EAAAd-1.5 g no mostró una reducción en el pico posprandial con respecto grupo de sacarosa (Gráfica 15). Por último, en la prueba de TOL los resultados fueron similares a la prueba de TOG y TOS, con respecto grupo de lactosa (Gráfica 16).



Gráfica 14. Comparación de glucemia de animales DMII experimental tratados con EAA 1.5 g (300 mg/kg), control con carbohidrato glucosa (1.5 g/kg) y control sin carbohidrato. Mediciones a las 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. $n=6$, $p \leq 0.05$, análisis por ANOVA de 1 vía.



Gráfica 15. Comparación de glucemia de animales DMII experimental tratados con EAA 1.5 g (300 mg/kg), control con carbohidrato sacarosa (3.0 g/kg) y control sin carbohidrato. Mediciones a las 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. $n=6$, $p \leq 0.05$, análisis por ANOVA de 1 vía.

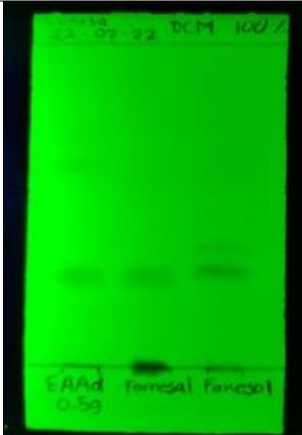
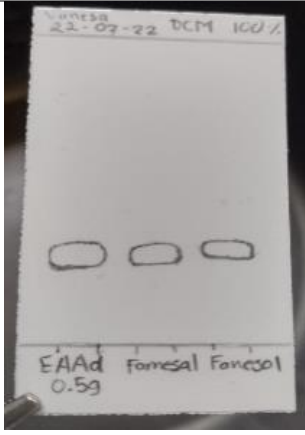
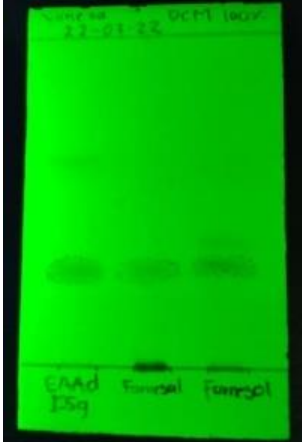
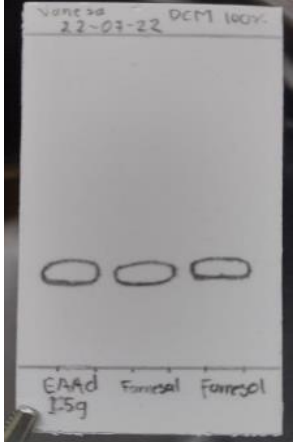
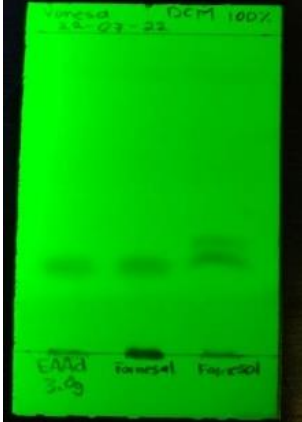



Gráfica 16. Comparación de glucemia de animales DMII experimental tratados con EAAAd 1.5 g (300 mg/kg), control con carbohidrato lactosa (4.0 g/kg) y control sin carbohidrato. Mediciones a las 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Resultados representados en la gráfica como el promedio de las glucemias \pm S.E.M. $n=6$, $p \leq 0.05$, análisis por ANOVA de 1 vía.

8.5 Realización del análisis fitoquímico de las tisanas de *Annona diversifolia* Safford.

Las muestras se analizaron mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice en dos sistemas de elución. En el primer sistema las muestras se disolvieron en 100% diclorometano (DCM) y al realizar cromatografía en capa fina se utilizó como fase estacionaria (gel de sílice) y fase móvil (diclorometano) con la finalidad de comparar el extracto de las tisanas con estándares reportados y así identificar terpenoides como farnesol y farnesal, grupos reportados en la literatura (Valdés et al., 2018) (Tabla 8, Tabla 10). Con los resultados obtenidos en esta prueba se puede apreciar que los RF de los estándares son muy similares a los de la muestra del EAAAd para las 3 tisanas así como para el EAAAd-1,5 g, sin embargo, mediante la técnica de cromatografía en capa fina no se puede asegurar si efectivamente farnesal y farnesol están presentes en la muestra por lo que se requiere de otras técnicas para la identificación de dichos compuestos químicos como la cromatografía de líquidos de alta resolución (Tabla 9, Tabla 11)

Tabla 8. Comparación de cromatoplasmas de tisanas de *A. diversifolia*.

Muestra	Fotografía con luz en onda larga	Fotografía sin luz
Extracto de tisana de 0.5 g		
Extracto de tisana de 1.5 g		
Extracto de tisana de 3.0 g		

Resultados presentados en la tabla con fotografías de cromatoplasmas con muestras de 3 tisanas (EAAAd-0.5, EAAAd-1.5 y EAAAd-3.0), estándares de farnesol y farnesol. Observados sin luz y con luz UV de onda larga.

Tabla 9. Factores de retención de tisanas de *A. diversifolia*.

Muestra	RF de EAd	RF de farnesal	RF por farnesol
Tisana de 0.5 g	0.2745	0.2745	0.2941
Tisana de 1.5 g	0.2941	0.2745	0.3137
Tisana de 3.0 g	0.2745	0.2745	0.2941

Resultados presentados en la tabla muestran los factores de retención de las 3 tisanas (EAd-0.5, EAd-1.5 y EAd-3.0), estándares de farnesol y farnesal.

Para el segundo sistema de elución además del EAd-1.5 g se incluyó una muestra del EEAd.1.5 g, dichas muestras se disolvieron en hexano: acetato de etilo 80:20 y al realizar cromatografía en capa fina se utilizó como fase estacionaria (gel de sílice) y fase móvil hexano: acetato de etilo 80:20 y se revelaron con ácido sulfúrico, para así identificar compuestos terpenoides en el extracto como farnesol y farnesal, grupos reportados en la literatura (Valdés, et al, 2018).

Tabla 10. Comparación de cromatoplas con muestras de EAd, EAd-1.5g, farnesal y farnesol.

	Fotografía de placa antes de revelar	Fotografía de placa después de revelar	Fotografía sin luz
Observada con luz a onda corta			
Observada con luz a onda larga			

Comparación de cromatoplas con muestras de EAd, EAd-1.5 g, farnesal y farnesol, en capa fina utilizando como fase estacionaria (gel de sílice) y fase móvil (hexano: acetato de etilo, 80:20), revelados con ácido sulfúrico. Observados con luz UV de onda corta y larga.

Tabla 11. Factores de retención de muestras de EAd, EAd, farnesal y farnesol.

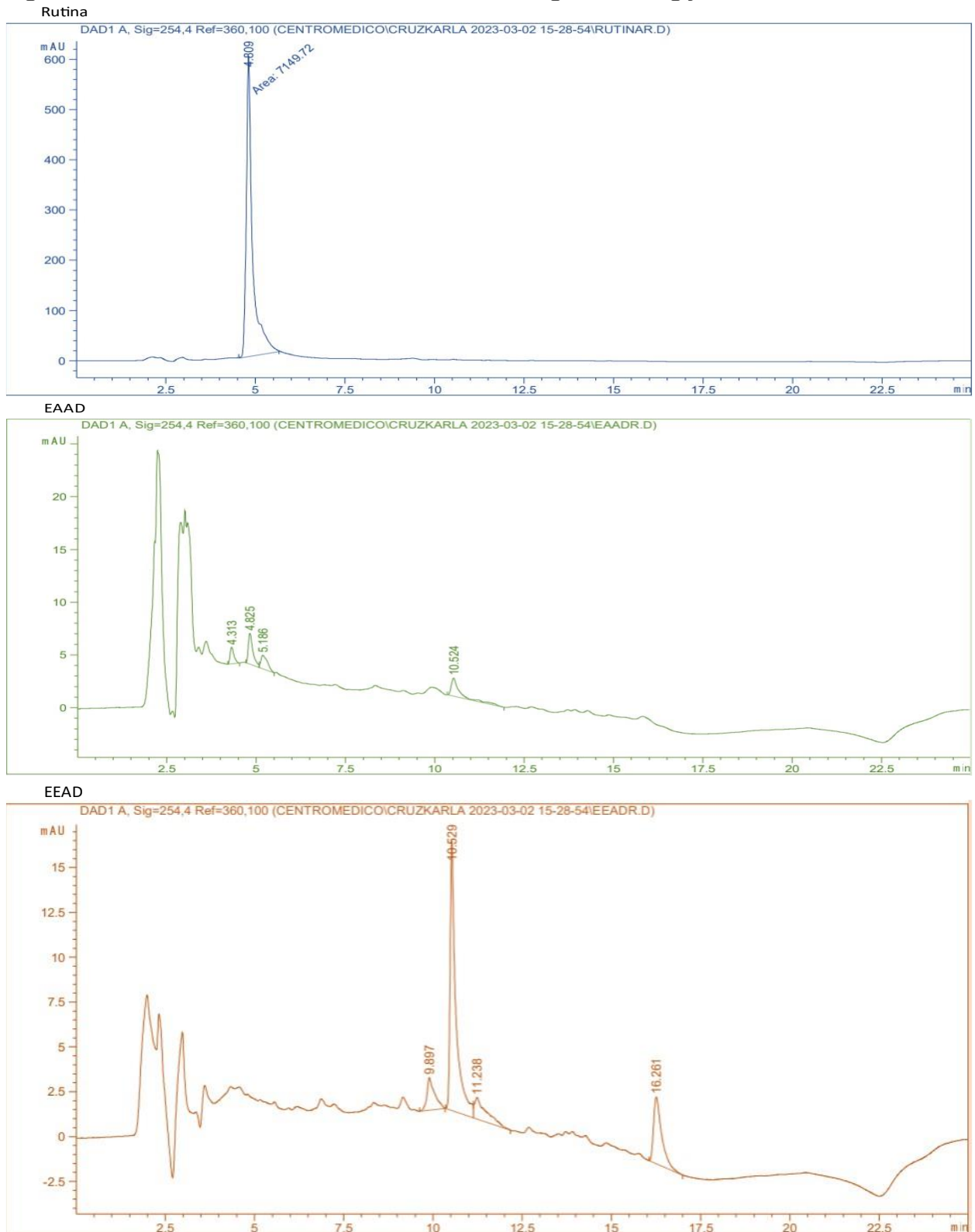
Muestra	RF de farnesal estándar	RF de farnesol estándar	RF farnesal	RF farnesol
EAd 1.5 g	0.900	0.275	0.925	0.275
EAd 1.5 g	0.900	0.275	0.900	0.250

Resultados presentados en la tabla muestran los factores de retención de EAd-1.5 g, EAd, farnesal y farnesol.

Análisis HPLC del extracto acuoso de *A. diversifolia* (1.5 g materia vegetal)

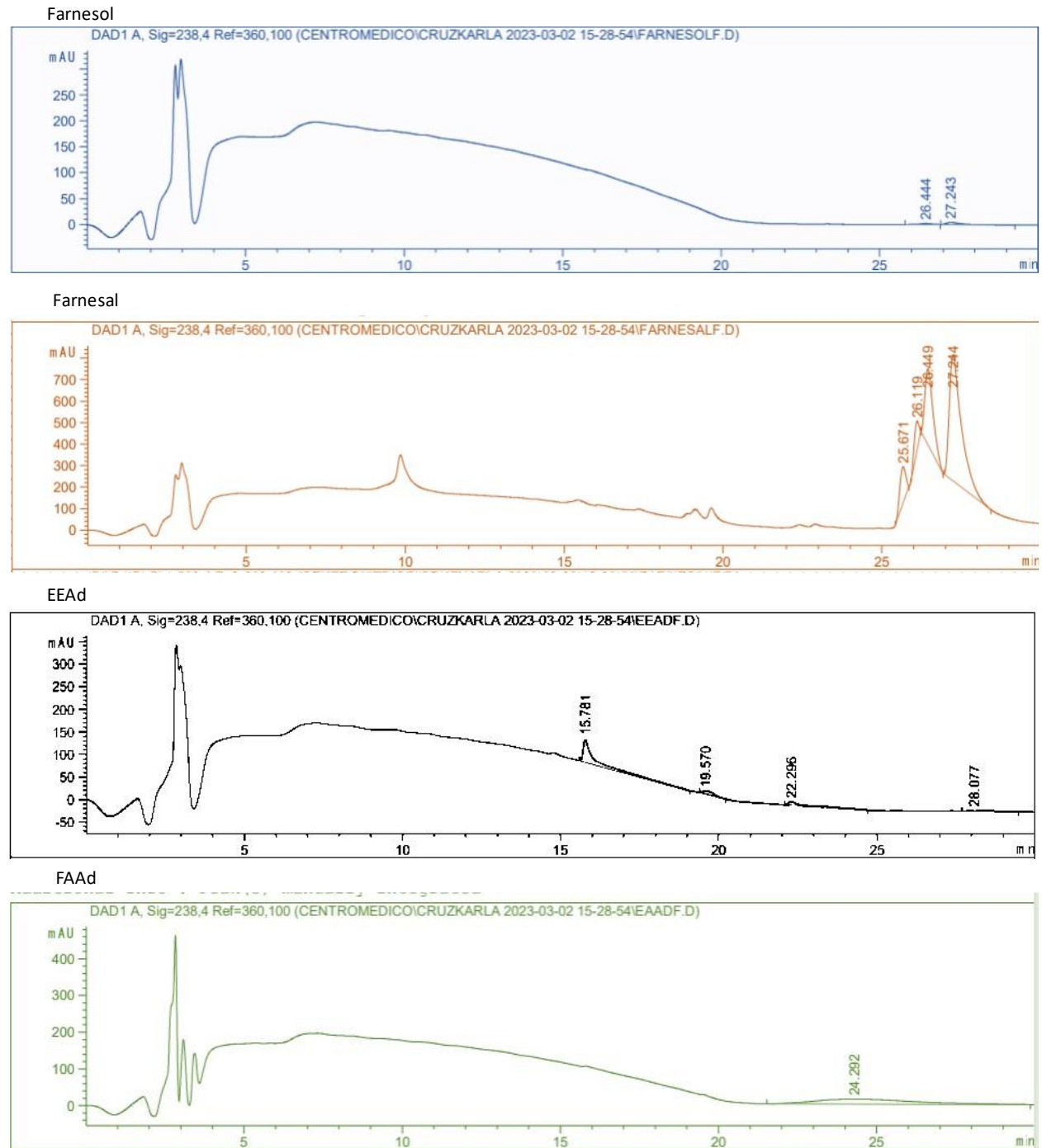
Los resultados del análisis del extracto acuoso de *A. diversifolia* (EAd-1.5 g) realizado mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de matriz de diodos (HPLC-DAD) junto con una muestra del extracto etanólico de hojas de *A. diversifolia* (EAd-1.5 g) utilizaron 2 sistemas diferente de trabajo. El primero fue diseñado para la identificación de flavonoides en donde se utilizó como estándar el glucósido de rutina. El análisis mostró la presencia de niveles elevados de rutina a los 4.825 min en el EAd-1.5 mientras que para el estándar de rutina fue de 4.809 min; en cambio en el EAd-1.5 no se observaron niveles elevados de rutina, pero si la presencia de otros flavonoides (Figura 3). El segundo sistema de trabajo está diseñado con las condiciones necesarias para la identificación de terpenoides en donde se utilizaron estándares de farnesal y farnesol, el análisis no mostró la presencia de farnesal y farnesol en el EAd-1.5 g ni en el EAd-1.5g mediante esta metodología posiblemente a la estructura química y propiedades fisicoquímicas de dichos compuestos (Figura 4). Ambas identificaciones se realizaron comparando sus tiempos de retención y espectro ultravioleta.

Figura 3. Análisis de HPLC-DAD a 254 nm de EAAd-1.5g, EEAd-1.5 g y rutina.



Resultados muestran el análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detección de matriz de diodos (HPLC-DAD) a 254 nm del extracto acuoso de hojas de *Annona diversifolia* EAAd-1.5 (verde), EEAd-1.5 (naranja) y el estándar de flavonoide rutina.

Figura 4. Análisis de HPLC-DAD a 238 nm del EAd-1.5 g, EEAd-1.5 g, farnesol y farnesol.



Resultados muestran el análisis de cromatografía líquida de alta resolución con detección de matriz de diodos (HPLC-DAD) a 238 nm del extracto acuoso de hojas de *Annona diversifolia* EAd-1.5 (verde), EEAd-1.5 (negro) y los estándares de farnesol y farnesol.

9. Discusión

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antihiper glucemiante de tisanas de hojas de *Annona diversifolia*, obtenidas mediante la técnica de infusión acua, sustentado bajo una ardua investigación de los estudios reportados de las hojas de *A. diversifolia*, como lo es el extracto etanólico obtenido a partir de esta especie que demostró tener actividad sobre los niveles de glucemia previamente descrito en la literatura (Valdés et al, 2020; Calzada et al., 2019), por lo que un extracto acuoso fue objeto de estudio como agente antihiper glucemiante.

Comenzado la investigación se estudiaron los efectos toxicológicos mediante la prueba de toxicidad oral aguda, los resultados obtenidos establecen una DL50 >2400 mg/kg, que cae dentro de la categoría 5 de conformidad con la directriz nº 423 de la OCDE, la cual indica que es de uso seguro y no tóxico.

Continuando la investigación se evaluaron tres tisanas (EAAAd) con diferentes concentraciones de las hojas de *A. diversifolia* en un modelo de ratones con DM II experimental inducido por estreptozocina-nicotinamida esto con el objetivo de evaluar la actividad de cada una de las tisanas. Con los resultados obtenidos se confirmó que la tisana que contiene 1.5 g de hoja de la plata en cuestión (EAAAd-1.5 g) tuvo mejor actividad antihiper glucemiante en comparación con la de 0.5 g y 3.0 g, mostrando diferencia estadísticamente significativa 4 horas después de la administración, además, a partir de los resultados obtenidos se determinó que la tisana actúa como un agente antihiper glucemiante.

Posteriormente fue evaluado el tratamiento EAAAd-1.5 g de manera subcrónica durante 6 semanas, se observó que el EAAAd-1.5 a dosis de 300 mg/kg logró disminuir los valores de hiper glucemia a lo largo de toda la prueba, este efecto fue similar al observado en la evaluación del fármaco control acarbossa, pero solo en la prueba aguda. Además, se observó que la administración subcrónica ayudó a reducir los valores de hiper glucemia a lo largo de las 6 semanas de tratamiento acompañado de una reducción del % de HbA1c y es posible interpretarlo como un buen manejo de la hiper glucemia, debido a que un buen manejo glucémico produce reducciones sustanciales y duraderas en la aparición y progresión de las complicaciones microvasculares (Davies et al, 2018). Con los resultados obtenidos, proponemos que la reducción efectiva de los niveles altos de glucosa en sangre generada por la administración del EAAAd-1.5 g ayuda a reducir el % de HbA1c debido a que reduce la absorción de glucosa.

Siguiendo con la investigación, se evaluó el mecanismo de acción como inhibidor de la enzima α -glucosidasa, debido a que uno de los principales enfoques para reducir la hiper glucemia en pacientes con DM II es la prevención de la hidrólisis de carbohidratos después

de la ingesta de alimentos. El mecanismo evaluado, se tiene ampliamente descrito ya que es posible evaluar la actividad *in vivo* como inhibidor de la enzima α -glucosidasa con pruebas de TOG, TOS y TOL (Calzada et al., 2017; Valdés et al., 2019). Los inhibidores de la α -glucosidasa son fármacos que impiden el aumento de los niveles plasmáticos de glucosa en pacientes con DM II, mediante la inhibición competitiva de las enzimas α -glucosidasas y α -glucosidasa-hidrolasas intestinales (glucoamilasa, sucrasa, maltasa e isomaltasa) ubicadas en el borde del cepillo de los enterocitos, por lo que impiden que estas enzimas degraden disacáridos y oligosacáridos a monosacáridos antes de su absorción; lo que provoca una baja producción de insulina postprandial mediante la disminución de glucosa postprandial, acarbosa, miglitol y voglibosa los cuales son los inhibidores de α -glucosidasa más utilizados (González & Ortiz, 2012). Tomando en cuenta lo anterior, se evaluó la actividad del EAd-1.5 g como posible inhibidor de la enzima α -glucosidasa de manera *in vivo*. Los resultados de la prueba TOS y TOG, tras la administración del EAd-1.5g no evidenciaron la disminución el pico postprandial de glucosa a lo largo de la prueba, mientras que el control farmacológico (acarbosa) y la muestra del EAd si demostraron disminución el pico postprandial de glucosa a las 0.5 h tras la administración de una carga de glucosa y sacarosa respectivamente. Mientras que para el caso de la prueba de TOL el EAd-1.5 g, el EAd y el control farmacológico si inhibieron el pico postprandial a la 1 h del tratamiento, ambos resultados son consistentes con lo observado en otros estudios donde sugieren que la inhibición del pico postprandial de glucosa se produce tras la administración de una carga de lactosa (Calzada et al., 2017; Valdés et al. 2020).

En investigaciones previas, se demostró la actividad antihiper glucemiante de farnesol, un sesquiterpeno, el cual fue en parte responsable de la actividad y que además fue aislado de *A. diversifolia* (Valdés et al., 2017). En la presente investigación se realizó la caracterización del EAd.1.5g mediante métodos cromatográficos, iniciando con una cromatografía en capa fina mediante la cual se intuía la presencia de farnesol y farnesal, sin embargo mediante esta metodología no era posible realizar la determinación de estos productos por lo que se realizó la identificación de este par de terpenos junto al flavonoide rutina, que de acuerdo con (Martínez et al., 2019) demostró su presencia en un extracto acuoso del mismo género (*Annona cherimolla*) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los resultados obtenidos mediante la tecnología de HPLC demostraron mediante los tiempos de retención de los estándares junto con los espectros, la presencia de rutina en el extracto acuoso, mientras que los 2 terpenos analizados no fueron posibles identificarlos tal y como en el caso del extracto etanólico, quizá esto se debe a que las presencia de estos terpenos sea en cantidades muy pequeñas para ser detectables, estos resultados nos ayudan a elucidar el mecanismo de acción

que sigue el extracto acuoso, ya que al comparar los productos de ambos extractos (etanólico-acuoso) nos evidencia el comportamiento de cada uno y nos abre el panorama para continuar investigando el posible mecanismo de acción.

10. Conclusión

El análisis completo de los resultados *in vivo*, demostraron el control de la hiperglucemia posterior a la administración del extracto acuoso de *A. diversifolia* en ensayos agudos y subcrónicos, mediante parámetros como glucemia, hemoglobina glicada, perfil lipídico y transaminasas séricas. No se comprobó que el extracto acuoso sigue el mismo mecanismo por el cual actúa el extracto etanólico de la misma planta, el cual inhibe la hidrólisis de disacáridos complejos y la absorción de monosacáridos mediante la inhibición de la enzima α -glucosidasa y la inhibición selectiva del cotransportador SGLT-1 en el intestino delgado. Además, en el análisis fitoquímico se evidenció la presencia de compuestos que resultan de interés para proponer el posible mecanismo de acción. Por último, estos resultados validan el uso de tisanas de *A. diversifolia* en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

11. Referencias

- American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37 Suppl 1, S81–S90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Arellano, O., Barquera, S., Barriguete, J., Lara, A., López, A., Rosas, M. (2015). Protocolo clínico para el diagnóstico y tratamiento de la Diabetes. 2da edición secretaria de salud. México. [Protocolo clínico para el diagnóstico y tratamiento de la Diabetes | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx \(www.gob.mx\)](#)
- Arroyo, D., Goicoeche, M. (2020). Fármacos Antidiabéticos Orales e Insulinas. Servicio de Nefrología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. <https://www.nefrologiaaldia.org/es-pdf-farmacos-antidiabeticos-orales-e-insulinas>
- Asociación Latinoamericana de Diabetes. (2019). Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia Edición 2019. Revistas ALAD. https://www.revistaalad.com/guias/5600AX191_guias_alad_2019.pdf
- Atriano-Briano, R. A., Benito-Cruz, B. (2021). “Medicina tradicional mexicana, cultura y tradición, un paso hacia la etnofarmacología.”, Revista Intercyt. Interculturalidad, Ciencia y Tecnología. En línea: <https://www.eumed.net/es/revistas/intercyt/intercyt-enero-2021/medicina-tradicional-mexicana>
- Basto-Abreu, A., López-Olmedo, N., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Moreno-Banda, G. L., Carnalla, M., Rivera-Dommarco, J. A., Romero-Martínez, M., Barquera, S., Barrientos-Gutiérrez, T. (2023). Prevalencia de prediabetes y diabetes en México. Ensanut 2022. *Salud Publica Mex.* 65(supl 1):S163-S168. <https://doi.org/10.21149/14832>
- Boletín epidemiológico cierre 2021. Dirección general de epidemiología. Secretaria de salud. Gobierno de México. [SVEHDM2-Anual2021.pdf \(www.gob.mx\)](#).
- Calzada, F., Valdés M., García-Hernández, N., Velázquez, C., Barbosa, E., Bustos-Brito, C., Quijano, L., Pina-Jimenez, E., Mendieta-Wejebe, J. (2019). Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona diversifolia* Safford. and farnesol on normal and alloxan-induced diabetic mice. *Pharmacognosy Magazine.* 15:S5–S11.
- Calzada, F., Solares-Pascasio, J. I., Ordoñez-Razo, R.M., Velázquez, C., Barbosa, E., García-Hernández, N., Mendez-Luna, D., Correa-Basurto, J. (2017). Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona cherimola* Miller on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res*, 9(1), 1-6.
- Carballo, A. I., Martínez, A. L., González-Trujano, M. E., Pellicer, F., Ventura-Martínez, R., Díaz-Reval, M. I., López-Muñoz, F. J. (2010). Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 95(1), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.11.017>
- Castro-Juárez, C. J., Villa-Ruano, N., Ramírez-García, S. A., Mosso-González, C. (2014). Uso medicinal de plantas antidiabéticas en el legado etnobotánico oaxaqueño. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 101-120. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000100012&lng=es&tng=es.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades [CDC]. (2021). *La diabetes tipo 2*. <https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/basics/type2.html>

- Davies, M. J., D'Alessio, D. A., Fradkin, J., Kernan, W. N., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tsapas, A., Wexler, D. J., Buse, J. B. (2018). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 1 December; 41 (12): 2669–2701. <https://doi.org/10.2337/dci18-0033>
- Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos. Directriz No. 423. OECD Test Guideline 423 (nih.gov)
- Donnan, K., Segar, L. (2019). Inhibidores de SGLT2 y metformina: terapia antihiper glucémica dual y el riesgo de acidosis metabólica en la diabetes tipo 2. *Revista europea de farmacología*, 846, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.002>
- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. L., Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., Stanton, R. C., Gabbay, R. A., on behalf of the American Diabetes Association. (2023). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes care*, 46(Suppl 1), S19–S40. <https://doi.org/10.2337/dc23-S002>
- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. L., Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., Stanton, R. C., Gabbay, R. A., on behalf of the American Diabetes Association. (2023). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care* 1 January 2023; 46 (Supplement_1): S140–S157. <https://doi.org/10.2337/dc23-S009>
- Flores, S. I. (2016). Factores de riesgo para diabetes mellitus tipo 2 en estudiantes que cursan el cuarto y quinto año de estudios de la Licenciatura de Medicina en la BUAP durante el 2016. [Tesis de licenciatura]. Repositorio institucional de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/14507>
- González-Esquinca, A. R., Luna-Cazáres, L. M., Schlie-Guzmán, M. A., Chacón, I. D., Laguna-Hernández, G., Flores-Breceda, S., Montoya-Gerardo, P. (2012). In Vitro larvicidal evaluation of *Annona muricata* L., *A. diversifolia* Saff. and *A. lutescens* Saff. Extracts Against *Anastrepha ludens* Larvae (Diptera, Tephritidae). *Interciencia*, 37(4), 284-289.
- González-Sánchez, A., Ortiz-Andrade, R. (2012). ¿Qué sabe usted acerca de...los antidiabéticos orales (ADO's)?. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(1), 79-84. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000100010&lng=es&tlng=es.
- González-Trujano, M. E., Navarrete, A., Reyes, B., Cedillo-Portugal, E., Hong, E. (2001). Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. *Planta medica*, 67(2), 136–141. <https://doi.org/10.1055/s-2001-11504>
- González-Trujano, M., Tapia, E., López-Meraz, L., Navarrete, A., Reyes-Ramírez, A., & Martínez, A. (2006). Anticonvulsant effect of *Annona diversifolia* Saff. and palmitone on penicillin-induced convulsive activity. A behavioral and EEG study in rats. *Epilepsia*, 47(11), 1810–1817. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00827.x>
- INEGI. (2022). Comunicado de prensa Núm. 657/22. Estadísticas a propósito del día mundial de la Diabetes (14 de noviembre). Datos Nacionales.

- https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_DIABETES2022.docx
- International Diabetes Federation. (2021). IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium. Available at: <https://www.diabetesatlas.org> (accessed on 13 enero 2023)
- Jiménez-Silva, A. (2017). Medicina tradicional. Boletín CONAMED-OPS. Órgano de difusión del centro colaborador en materia de calidad y seguridad del paciente. http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin13/medicina_tradicional.pdf
- Lenzen, S. (2007). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. *Diabetología* 51:216–226. Institute of Clinical Biochemistry, Hannover, Germany. DOI:10.1007/s00125-007-0886-7
- Martínez-Solís, J.; Calzada, F.; Barbosa, E.; Valdés, M. (2021). Antihyperglycemic and Antilipidemic Properties of a Tea Infusion of the Leaves from *Annona cherimola* Miller on Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Molecules*, 26,2408. <https://doi.org/10.3390/molecules26092408>
- Mellado-Orellana, R., Salinas-Lezama, E., Sánchez-Herrera, D., Guajardo-Lozano, J., Díaz-Greene, E. J., Rodríguez-Weber, F. L. (2019). Tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 dirigido a pacientes con sobrepeso y obesidad. *Medicina interna de México*, 35(4), 525-536. <https://doi.org/10.24245/mim.v35i4.2486>
- Murrieta, D. U. (2020). Evaluación de propiedades antioxidantes de extractos ricos en ciclopéptidos obtenidos de *Annona diversifolia*. [Tesis de maestría]. Repositorio institucional de la Universidad Autónoma de Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/server/api/core/bitstreams/39d97d5e-7aea-41f9-abe8-e57bba85b09a/content>
- Norma Oficial Mexicana NOM 015- SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4215/salud/salud.htm>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 062ZOO.PDF (unam.mx)
- Organización Mundial de la Salud. (2023). Diabetes. [Diabetes \(who.int\)](https://www.who.int)
- Organización Panamericana de la Salud. (2020). Diagnóstico y manejo de la diabetes de tipo 2 (HEARTS-D). Washington, D.C.: Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331710>
- Radenković, M., Stojanovic, M., Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 78; 13–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Rodríguez-Rivera, N., Cuautle-Rodríguez, P., Molina-Guarneros, J. (2017). Hipoglucemiantes orales para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2: uso y regulación en México. *Rev Hosp Jua Mex* ;84(4):203-211.
- Schlie-Guzmán, M. A., García-Carrancá, A., González-Esquinca, A. R. (2009). In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* saff. *Phytother. Res.*, 23: 1128-1133. <https://doi.org/10.1002/ptr.2760>
- Sierra-Zurita, D. (2019). Compuestos con valor nutricional y nutracéutico en frutos de llama (*Annona diversifolia* Saff) en madures de consumo. . [Tesis de maestría]. Repositorio institucional de la Institución de enseñanza e Investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, México.

http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/10521/3216/1/Sierra_Zurita_D_MC_F_ruticultura_2018.pdf

- Solares-Pascasio, J.I., Ceballos, G., Calzada, F., Barbosa, E., Velazquez, C. (2021). Antihyperglycemic and Lipid Profile Effects of *Salvia amarissima* Ortega on Streptozocin-Induced Type 2 Diabetic Mice. *Molecules*, 26, 947. <https://doi.org/10.3390/molecules26040947>
- Torre, E.M., Tejedor, J.L., Menéndez, S.A., Núñez-Cortés, J.M., García, A.A., Domingo, M.P., Soláns, J.R., Guisasola, F.Á., Alegría, J.G., Bravo, J.J., Fernández-Santos, C.M., González, R.R. (2011). Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Documento de consenso. *Rev. Nefrología. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología*; 31, 17-26. doi:10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10715
- Valdés, M., Calzada, F., Mendieta-Wejebe, J. E., Merlín-Lucas, V., Velázquez, C., Barbosa, E. (2020). Antihyperglycemic Effects of *Annona diversifolia* Safford and Its Acyclic Terpenoids: α -Glucosidase and Selective SGLT1 Inhibitors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(15), 3361. <https://doi.org/10.3390/molecules25153361>
- Valdés, M.; Calzada, F.; Mendieta-Wejebe, J. (2019). Structure-activity relationship study of acyclic terpenes in blood glucose levels: Potential α -glucosidase and sodium glucose cotransporter (SGLT-1) inhibitors. *Molecules*, 24, 4020. <https://doi.org/10.3390/molecules24224020>
- Wright, E. M. (2021). Inhibidores de SGLT2: fisiología y farmacología. *Riñón* 360, 2(12), 2027–2037. <https://doi.org/10.34067/KID.0002772021>
- Xu, B., Li, S., Kang, B. y Zhou, J. (2022). El papel actual de los inhibidores del cotransportador 2 de sodio-glucosa en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Diabetología cardiovascular*, 21(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s12933-022-01512-w>