

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION DEL MECANISMO ANTIDIABETICO
DE LA FRACCION II DE *Larix lepidus* Y
CARACTERIZACION DEL PRINCIPIO ACTIVO

POR:

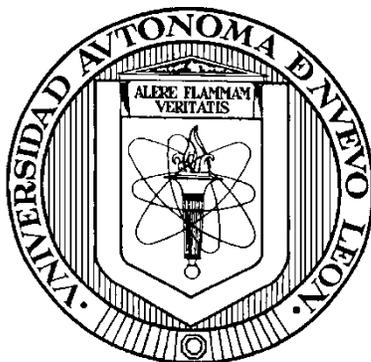
Q.C.B. DIANA MARLENE CASTILLO GARZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN FARMACOLOGIA
Y TOXICOLOGIA

JULIO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL MECANISMO ANTIDIABÉTICO DE LA FRACCIÓN II DE
Lentinus lepideus Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO**

Por

Q.C.B. DIANA MARLENE CASTILLO GARZA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
en Farmacología y Toxicología**

JULIO 2014

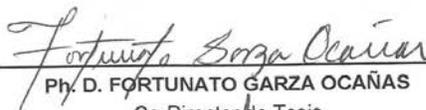
EVALUACIÓN DEL MECANISMO ANTIDIABÉTICO DE LA FRACCIÓN II DE

***Lentinus lepideus* Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO**

Aprobación de la Tesis:



Dr. en C. MARIA TERESA ZANATTA CALDERÓN
Director de Tesis



Ph. D. FORTUNATO GARZA OCAÑAS
Co-Director de Tesis



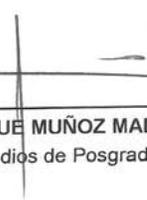
Dr. med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Comisión de Tesis



Dr. med. ORALIA BARBOZA QUINTANA
Comisión de Tesis



Dr. en C. EDGAR ABRAHAM GARCÍA ZEPEDA
Comisión de Tesis



Dr. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL MECANISMO ANTIDIABÉTICO DE LA FRACCIÓN II DE
Lentinus lepideus Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO**

Presentado por:

Q.C.B. DIANA MARLENE CASTILLO GARZA

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología así como en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dr.en C. María Teresa Zanatta Calderón y la codirección del Ph. D. Fortunato Garza Ocañas, la Dr. *med.* Lourdes Garza Ocañas, Dr.*med.* Oralia Barboza Quintana y el Dr. en C. Edgar Abraham García Zepeda.

Diana Marlene Castillo Garza

Fecha de Graduación: Julio 2014

AGRADECIMIENTOS

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina.

Título del estudio: EVALUACIÓN DEL MECANISMO ANTIDIABÉTICO DE LA
FRACCIÓN II DE *Lentinus lepideus* Y CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO.

Número de páginas: 101

Candidato para la obtención del Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en
Farmacología y Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología.

Propósito y Método del Estudio: Los macromicetos han sido usados ampliamente en la medicina tradicional de países orientales para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la diabetes mellitus. En el presente trabajo se evaluó la actividad de *Lentinus lepideus*, una especie del noreste de México que ha demostrado actividad antidiabética y antioxidante, específicamente la Fracción II obtenida del extracto acuoso, con el objetivo de determinar el posible mecanismo de acción así como determinar si el efecto antioxidante proporciona protección contra el daño observado en la diabetes. Se diseñaron cuatro grupos de experimentación, control, diabéticas y diabéticas tratadas con la Fracción II o Glibenclamida. Las ratas recibieron el tratamiento con la Fracción II y Glibenclamida durante 21 días. Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de sangre, hígado, riñón y páncreas. Posteriormente se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: insulina, glucógeno hepático, glucosa-6-fosfatasa, así como la prueba de inhibición de alfa-glucosidasa, con el propósito de determinar el posible mecanismo de acción antidiabético de la Fracción II. También se realizaron las determinaciones de glutatión, lipidoperoxidación y un análisis morfológico con el fin de evaluar si la Fracción II mostraba efecto antioxidante protector contra el estrés oxidativo producido por la hiperglucemia. Se realizó análisis químico preliminar para caracterizar los compuestos presentes en la Fracción II. La Fracción II de *Lentinus lepideus* produjo liberación de insulina medida el día 21 de tratamiento. En cuanto al efecto antioxidante, éste fue evidente en todas las pruebas realizadas a nivel hepático donde los niveles de glutatión en las ratas diabéticas tratadas con la Fracción II fueron similares a los presentados por las ratas sanas y produjo una disminución en la peroxidación de lípidos, lo que confirma el efecto antioxidante.

Contribuciones y conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran que la Fracción II de *Lentinus lepideus* tiene como mecanismo de acción la liberación de insulina, además revirtió todos los parámetros oxidativos alterados por el proceso de diabetes. El espectro de RMN-¹H de la Fracción II de *Lentinus lepideus* indicó que él o los compuestos activos son polisacáridos de tipo α-D-glucanos.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. en C. María Teresa Zanatta Calderón

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mis padres Anabel Garza Tamayo y Héctor Castillo Pecina les agradezco su amor, apoyo incondicional, y todos esos sacrificios que tuvieron que pasar para facilitarme mis estudios, por hacerme ver que a pesar del camino que llegue a tomar siempre estarán ahí.

A ti amor, Rolando Carrizales por toda la confianza que depositaste en mí, por hacerme tan feliz, pero sobre todo por seguir a mi lado en este largo camino incondicionalmente.

A mis hermanos Adriana Castillo y Hector Castillo por escucharme, y alentarme a seguir adelante, por todos los buenos momentos que pasamos cuando podemos estar juntos, los quiero mucho.

A la Dr. en C. María Teresa Zanatta Calderón asesor de esta tesis, por confiar en mí, por sus consejos y regaños que me hicieron una mejor persona y mejor estudiante, por brindarme su amistad, su conocimiento y su interés en la culminación de mis estudios.

A la *Dr.med.* Lourdes Garza Ocañas por su asesoría, su apoyo y dedicación, por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto, pero sobre todo por brindarme la oportunidad de pertenecer a este posgrado.

A los miembros de mi comisión Ph. D. Fortunato Garza Ocañas por facilitar la cepa del hongo con la que se realizó este estudio, *Dr. med.* Oralia Barboza Quintana por el apoyo brindado en el servicio de patología y especialmente al *Dr. en C.* Edgar Abraham García Zepeda por su tiempo, paciencia, por compartir conmigo su conocimiento y abrirme las puertas de QPN para culminar este proyecto.

A la *Dr. en C.* Verónica Mayela Rivas Galindo responsable del análisis de RMN por el apoyo y tiempo que me brindo para comprender los espectros obtenidos en este proyecto.

A la *Dra.* Gabriela Alarcón Galván patólogo del servicio de anatomía patológica y citopatología por el apoyo y tiempo brindado en la evaluación morfológica de este estudio.

A Rómulo Flores y Alberto Cárdenas por brindarme su ayuda, tiempo, por su interés en este trabajo, por escucharme y sobre todo por esos momentos que tanto me hicieron reír. Sé que serán unos médicos excelentes.

A mis compañeros del posgrado Tatiana, Argentina, Sandra, Triana y Lennon por los buenos momentos que pasamos durante el transcurso de este posgrado.

A mis amigos de QPN Jessy, Karen y Tadeo por hacer mi estancia en el laboratorio más sencilla, por su cariño y por aceptarme en su grupo.

A mis profesores y a todas las personas que a lo largo de este camino tuve la fortuna de conocer, por brindarme su apoyo, su confianza, por ayudarme a que esta meta fuera más sencilla de cumplir, por dejarme ser parte de su vida.

A CONACYT por aceptarme como becario bajo el número de registro 251549 y por la beca otorgada con el número 60144 para la realización de este proyecto de tesis.

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Factores asociados a la expresión de Diabetes Mellitus.....	2
Tabla 2. Clasificación de la Diabetes de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes.....	3
Tabla 3. Compuestos aislados de <i>Lentinula edodes</i> y su actividad relacionada...	11
Tabla 4. Grupos de estudio .	31
Tabla 5. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de glucógeno. .	36
Tabla 6. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de glucosa-6-fosfatasa.	39

Tabla 7. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de glutatión.	42
Tabla 8. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de peroxidación de lípidos.....	44
Tabla 9. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de proteínas.....	46
Tabla 10. Miligramos (mg) y porcentaje de recuperación de extractos acuosos...	54
Tabla 11. Cantidad obtenida (mg) y porcentaje de recuperación de las Fracción II de <i>Neolentinus lepideus</i>	54
Tabla 12. Porcentaje de reducción de glucosa en los diferentes grupos de estudio.....	55
Tabla 13. Promedio de peso corporal por grupo de estudio.....	57
Tabla 14. Secreción de insulina en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.	59
Tabla 15. Niveles de glucógeno hepático en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.....	60
Tabla 16. Actividad de la glucosa-6-fosfatasa en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.	62
Tabla 17. Porcentaje de inhibición de alfa-glucosidasa.....	63
Tabla 18. Concentración de proteínas en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.	64

Tabla 19. Niveles de glutatión (GSH) en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.	66
Tabla 20. Niveles de peroxidación de lípidos (MDA) en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto del crecimiento de <i>Neolentinus lepideus</i> silvestre.	10
Figura 2. Obtención de los extractos acuosos y metanólicos a partir de la biomasa seca de <i>Neolentinus lepideus</i>	26
Figura 3. Fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso de <i>Neolentinus lepideus</i>	28
Figura 4. Técnica utilizada para la administración de aloxana vía intraperitoneal a ratas Wistar machos.	30
Figura 5. Técnica utilizada para la administración de los diferentes tratamientos por sonda orogástrica a ratas wistar machos.	32
Figura 6. Técnica utilizada para la medición de glucosa en sangre de la vena caudal de la rata.	33
Figura 7. Aspecto del carporforo <i>Neolentinus lepideus</i>	51
Figura 8. Diferentes aspectos del crecimiento de <i>Neolentinus lepideus</i> en medio sólido.	52
Figura 9. Aspecto del macromiceto <i>Neolentinus lepideus</i> en medio líquido mostrando formación de primordios.	53
Figura 10. Aspecto de la biomasa filtrada obtenida de <i>Neolentinus lepideus</i>	53
Figura 11. Niveles de glucosa en los diferentes grupos de estudio.	56
Figura 12. Comportamiento del peso corporal de los animales al inicio y al término del estudio.	58

Figura 13. Niveles de Insulina en sangre en los diferentes grupos de estudio.....	59
Figura 14. Niveles de Glucógeno hepático en los diferentes grupos de estudio ..	61
Figura 15. Niveles de Glucosa-6-fosfatasa hepática en los diferentes grupos de estudio.....	62
Figura 16. Inhibición de la alfa-glucosidasa.....	64
Figura 17. Niveles de Proteína en hígado y riñón de rata en los diferentes grupos de estudio.....	65
Figura 18. Niveles de Glutación en hígado y riñón de rata en los diferentes grupos de estudio.....	67
Figura 19. Niveles de Peroxidación lipídica (MDA) en hígado y riñón de rata en los diferentes grupos de estudio.....	69
Figura 20. Morfología del hígado en los diferentes grupos de estudio, tinción H y E, 40X: a) Control (-), b) Diabéticas, c) Fracción II, d) Glibenclamida.	70
Figura 21. Morfología del páncreas en los diferentes grupos de estudio, tinción HyE, 40X: a) Control (-), b) Diabéticas, c) Fracción II, d) Glibenclamida.....	71
Figura 22. Morfología de riñón en los diferentes grupos de estudio, tinción H y E, 40X: a) Control (-), b) Diabéticas, c) Fracción II, d) Glibenclamida.	72
Figura 23. Positividad para la prueba fenol-ácido sulfúrico de la Fracción II.....	73
Figura 24. Hidrólisis de un polisacárido.....	73
Figura 25. Sistema cromatográfico obtenido de los residuos por separación en columna	74

Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H del residuo 75:25 obtenido de la hidrólisis de la Fracción II.....	75
Figura 27. Comparación de los espectros de RMN- ¹ H (D ₂ O, 300 o 400 MHz) de: a) polisacáridos obtenidos de <i>Lentinus edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Piptoporus betulinus</i> y <i>Laetiporus sulphureus</i> , b) polisacáridos obtenidos de la Fracción II de <i>Neolentinus lepideus</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
cm	Centímetro
CaCl ₂	Cloruro de calcio
FeCl ₃	Cloruro férrico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
KCl	Cloruro de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
IC 50	Concentración inhibitoria 50
dL	Decilitro
D.E.	Desviación estándar
D-glucosa	Dextrosa
DM	Diabetes mellitus
DNTB	5,5-ditiobis-(2-ácido nitro benzoico)
SDS	Duodecil sulfato de sodio
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ROS	Especies reactivas de oxígeno

EP	Exopolisacárido
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Fosfato de amonio
°C	Grados centígrados
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
FII	Fracción II
g	Gramo
GSH	Glutación
NaOH	Hidróxido de sodio
h	horas
IC	Intervalo de confianza
i.p.	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
L	Litro
MDA	Malonilaldehido
min	minuto
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minuto
M	Molar

mM	Milimolar
(-)	Negativo
n	Número de muestra
nm	Nanómetro
nmol	Nanomoles
OMS	Organización Mundial de la Salud
PNPG	<i>p</i> -nitrofenil- α -D-glucopiranososa
pH	Potencial de hidrógeno
%	Porcentaje
(+)	Positivo
PQM	Productos Químicos Monterrey
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.p.m.	Revoluciones por minuto
MgSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
v.o.	Vía oral
UV	Ultravioleta
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
VIS	Visible

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 DIABETES MELLITUS.....	2
1.1.2 Diabetes mellitus tipo I ó insulino dependiente	3
1.1.3 Diabetes mellitus tipo II ó no insulino dependiente	4
1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus	5
1.3 Epidemiología en México.....	5
1.4 Modelos animales de diabetes mellitus	6
1.5 Tratamiento de la diabetes mellitus	7
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. MATERIAL Y MÉTODO.....	16
2.1 MATERIAL.....	16
2.1.1 Material biológico	16
2.1.2 Material y equipo.....	17
2.1.3 Reactivos	19
2.2 MÉTODOS.....	23
2.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido.	23
2.2.2 Preparación del medio de cultivo líquido	24
2.2.3 Cultivo de los micetozoa en medio sólido.	24
2.2.4 Cultivo de los micetozoa en medio líquido.....	24
2.2.5 Obtención de la biomasa.....	25
2.2.6 Obtención de los extractos metanólicos a partir de la biomasa.	25
2.2.7 Obtención de los extractos acuosos a partir de la biomasa.	26
2.2.8 Fraccionamiento biorregulado del extracto acuoso de <i>Neolentinus lepideus</i> . .27	
2.2.9 Evaluación de la actividad antidiabética	29
2.2.10 Obtención de muestras	34
2.2.11 Determinación de niveles de insulina en sangre.....	35
2.2.12 Determinación de glucógeno.....	35
2.2.13 Determinación de glucosa-6-fosfatasa.	38

2.2.14 Inhibición de la alfa-glucosidasa.....	40
2.2.15 Determinación de los niveles de glutatión.....	41
2.2.16 Determinación de los niveles de peroxidación de lípidos.....	43
2.2.17 Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	45
2.2.18 Análisis morfológico.	47
2.2.19 Caracterización química.	49
2.2.20 Análisis estadístico	50
3. RESULTADOS	51
3.1 Material fúngico.	51
3.1.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Neolentinus lepideus</i> en medio sólido.	52
3.1.3 Cultivo de <i>Neolentinus lepideus</i> en medio líquido.	52
3.1.3 Obtención de biomasa de <i>Neolentinus lepideus</i>	53
3.1.4 Obtención de extractos acuosos de <i>Neolentinus lepideus</i>	54
3.1.5 Fraccionamiento biodirigido de <i>Neolentinus lepideus</i>	54
3.2 Evaluación de la actividad antidiabética de la Fracción II obtenida de <i>Neolentinus lepideus</i>	55
3.3 Determinación de niveles de insulina en sangre.....	58
3.4 Determinación de glucógeno.	60
3.5 Determinación de glucosa-6-fosfatasa.....	61
3.6 Inhibición de la alfa-glucosidasa.	63
3.7 Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	64
3.8 Determinación de los niveles de glutatión.....	65
3.9 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.....	67
3.10 Análisis morfológico.	69
3.11 Caracterización química.	73
4. DISCUSIÓN.....	76
5. CONCLUSIONES	86
6. BIBLIOGRAFÍA	88
APÉNDICE I.....	93

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad que representa un reto de salud global; estimaciones de la OMS indican que mientras en 1995 había en el mundo 30 millones de personas con diabetes, actualmente se estima que 371 millones de personas la padecen. El reto en términos de lo que representa para la sociedad es doble: por un lado, el importante monto de recursos que requieren los prestadores de servicios de salud para su atención, y por el otro el costo económico y emocional para las personas con diabetes y sus familias. (1,2,3)

Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. ⁽¹⁾ Modificaciones en el estilo de vida, en particular en la dieta y actividad física, así como evitar el tabaquismo, pueden retrasar su progresión. Sin embargo, su costo-efectividad depende de su implementación a escala poblacional, en particular en países con elevado riesgo de diabetes. ⁽²⁾

1.1 DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es un síndrome metabólico definido por la presencia de hiperglucemia crónica, de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente, ocasiona complicaciones de salud graves como infarto al miocardio, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura.^(4,5,6,7)

La clasificación clásica de la diabetes incluye dos grandes tipos: diabetes mellitus insulino dependiente y diabetes mellitus no insulino dependiente. Sin embargo, actualmente se han acumulado nuevos conocimientos en los que se han identificado defectos a nivel de células, tejidos o funciones que están relacionados con la expresión de la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Factores asociados a la expresión de diabetes mellitus.

Enfermedades de páncreas exócrino: Pancreatitis, pancreatomectomía, neoplasia, fibrosis quística	Infecciones: Rubéola, citomegalovirus, <i>Coxsackievirus</i>
Endocrinopatías: Acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma, feocromocitoma y otros tumores endocrinos	Inducción por fármacos o químicos: Pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, tiazidas, fenitoína
Defectos genéticos de la insulina: Leprechaunismo, síndrome de Rabson-Mendenhall, diabetes lipoatrófica	

La Asociación Americana de Diabetes, estandarizó la clasificación de la diabetes en diabetes mellitus tipo I y tipo II (Tabla 2).⁽⁶⁾

Tabla 2. Clasificación de la diabetes de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes.

Diabetes mellitus tipo I	Diabetes mellitus tipo II
Relacionada con la inmunidad	Gestacional
Idiopática	Factores genéticos
	Factores endócrinos
	Fármacos o químicos
	Infecciones

1.1.2 DIABETES MELLITUS TIPO I Ó INSULINODEPENDIENTE

Este tipo de diabetes se presenta como consecuencia de la destrucción de origen autoinmune de las células beta pancreáticas. La agresión autoinmune comienza años antes de que se altere la secreción de insulina, de tal modo que cuando se diagnostica la DM, las células beta están dañadas de forma irreversible, afecta por lo general a individuos menores de 20 años de edad. Sólo del 5 - 10% de los pacientes diabéticos están incluidos en esta categoría.^(8,9)

Los pacientes con DM tipo I presentan después de unos cuantos días o semanas de poliuria, polidipsia y pérdida de peso, con un incremento en las concentraciones de glucosa en suero. Los cuerpos cetónicos también aumentan debido a la carencia de insulina, lo que suele producir una acidosis grave que pone en peligro la vida (cetoacidosis diabética).⁽⁴⁾

El tratamiento de la DM tipo I se basa en la administración de insulina y consiste en realizar el reemplazo imitando en forma dinámica la secreción pancreática de insulina por lo que se utilizan dosis basales y pre-prandriales, aplicando diferentes esquemas terapéuticos adaptadas a las necesidades de cada individuo.^(11, 12,13)

1.1.3 DIABETES MELLITUS TIPO II O NO INSULINO DEPENDIENTE

La DM tipo II es la forma más común de diabetes, se presenta en 90-95% de los casos, siendo más frecuente en adultos, se asocia con el aumento de la resistencia a los efectos de la insulina en sus sitios de acción, así como una disminución de la secreción de insulina por el páncreas, no se sabe con certeza si la lesión primaria es la liberación anormal de insulina en la célula del islote o la resistencia a la insulina. En el 85% de los casos se vincula con obesidad, lo cual es otro factor que incrementa la resistencia a la insulina.⁽⁸⁾

1.2 COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS

Existen evidencias que sugieren que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo contribuyen a la aparición, progresión y complicaciones de la DM.⁽⁹⁾Nuevas estrategias terapéuticas orientadas a disminuir producción de ROS en la hiperglucemia para así contrarrestar sus efectos perjudiciales podrían ser un complemento útil en terapias convencionales destinadas a normalizar la glucosa en sangre.

Las complicaciones de la diabetes son tan comunes que se ha reportado que de cada 100 personas con diabetes 14 presentan nefropatía, 10 neuropatía, 10 pie diabético (uno de cada 3 termina en amputación) y 5 presentan ceguera. Además los pacientes diabéticos tienen 3 veces más riesgo de padecer cardiopatías o enfermedades cerebro-vasculares y presentan trastornos depresivos y cambios de personalidad.^(7,10,11,12)

1.3 EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO

Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país, superando al cáncer y problemas cardiovasculares.⁽²⁾Los datos de la ENSANUT 2012 identifican a 6.4 millones de adultos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. El total de personas adultas con diabetes podría

ser incluso el doble, de acuerdo a las evidencias previas sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición.⁽¹³⁾

1.4 MODELOS ANIMALES DE DIABETES MELLITUS

Existen diferentes modelos para producir diabetes mellitus en animales de experimentación, se utilizan tanto para el estudio de la etiología de la DM como para el estudio de los mecanismos involucrados en las complicaciones diabéticas a largo plazo, ya que las características generales de la diabetes en animales son similares a las de la diabetes humana.

Los modelos utilizados son cuatro: el uso de agentes químicos para la inducción de diabetes donde encontramos la estreptozotocina y aloxana sustancias químicas capaces de provocar diabetes debido a su toxicidad específica sobre las células beta pancreáticas,⁽¹⁴⁾ los modelos en los que se induce diabetes mediante procedimientos quirúrgicos, modelos en los que se induce por infecciones víricas y los modelos de diabetes espontánea en donde se somete al animal a una dieta alta en grasa durante tiempo prolongado.⁽¹⁵⁾

1.5 TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS

El tratamiento de la DM tipo II emplea tanto medidas farmacológicas así como no farmacológicas orientadas al manejo nutricional y a la actividad física. Dentro de las medidas farmacológicas se encuentran los secretagogos de insulina que incluyen: sulfonilureas, meglitinidas, análogos de incretina que pueden emplearse solos o combinados entre ellos y en algunos casos con insulina, dentro de sus características se encuentran: la estimulación de liberación de insulina, disminución de las concentraciones séricas de glucagon y que pueden causar hipoglucemia. ^(16,17)

Existe un nuevo medicamento aprobado para el tratamiento de DM tipo I llamado pramlintida un análogo de amilina un pequeño péptido de la hormona que se libera en el torrente sanguíneo por las células β del páncreas junto con la insulina, después de una comida. Al igual que la insulina, amilina está totalmente ausente en las personas con diabetes de tipo I. ^(18,19)

También se hace uso de los antihiperoglucemiantes que incluyen a: las biguanidas las cuales disminuyen la producción hepática de glucosa, inhiben la absorción de glucosa por el intestino e incrementan el almacenamiento de glucógeno en músculo estriado. Las tiazolidinedionas que producen aumento de la sensibilidad a la insulina y los Inhibidores de la alfa-glucosidasa que disminuyen la absorción de carbohidratos en tubo digestivo. Ninguno de estos medicamentos causa hipoglucemia. ^(16,20,21)

Debido a que la DM es una de las principales causas de morbi-mortalidad en México y el costo de su tratamiento es elevado y de por vida, los efectos secundarios y las complicaciones del uso crónico de los fármacos, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para este padecimiento constituye un campo de interés creciente.

Se conocen a nivel mundial alrededor de 800 plantas para el tratamiento de diabetes de las cuales 150 a 270 se encuentran en México entre las que destacan: *Scrocomia mexicana*, *Anacardium occidentale*, *Bidens pilosa*, *Bromelia baratas*, *Coutarea latiflora*, *Eucalyptus globulus*, *Taraxacum officinale*, *Valeriana mexicana*, entre otras, ^(22,23,24,25) sin embargo, existe muy poca información científica que apoye sus efectos antidiabéticos.

Otro campo de interés destacable es el uso de hongos (Basidiomicetos) cuyos efectos medicinales datan de más de 7,000 años en países asiáticos dentro de su medicina tradicional, ^(26,27,28,29,30) por lo que actualmente el uso de los hongos se ha extendido alrededor del mundo, debido tanto a su aporte nutricional como a su potencial terapéutico. ^(31,32,33,40)

México es un país destacado por su alta diversidad de hongos, y se considera que existen en el país 200,000 especies, de las cuales se conocen aproximadamente 7,000 que se han estudiado y clasificado taxonómicamente.

^(34,35)

Respecto al uso de hongos como antidiabéticos existen abundantes reportes sobre moléculas presentes en ellos responsables de esta actividad, tal es el caso de Ganopoly, Ganoderan A y B, glucanos obtenidos del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum*,^(36,37) o el coriolan, una proteína compleja unida a un β -glucano obtenido de la biomasa de *Trametes versicolor*⁽³⁸⁾ mostrando disminución de los niveles de glucosa y de los síntomas de la diabetes.

La Fracción SX caracterizada como polisacárido obtenido de *Grifolia frondosa* demostró actividad antidiabética en 5 pacientes con DM tipo II.^(39,41,42,43) Estudios realizados por Kiho y colaboradores confirmaron el efecto hipoglicémico de exopolisacáridos obtenidos de *Agrocybe cylindracea*, *Tremellea auruntia*, *Cordyceps sinensis* y *Pestalotiopsis sp.*^(44,45,46,47)

Lentinula edodes, también conocido como Shiitake, es el segundo hongo comestible más cultivado en el mundo y se encuentra dentro de los basidiomicetos orientales más estudiados. Su uso en Asia data desde hace más de 2,000 años. De este macromiceto se han aislado compuestos como la lentina, compuesto patentado por su actividad antineoplásica la cual está mediada por la estimulación del sistema inmune.^(29,48,49,50,51)



Figura 1. Aspecto del crecimiento de *Lentinula edodes*

Compuestos aislados de *Lentinula edodes* como el exopolisacárido (EP) soluble en agua han demostrado actividad antidiabética, la cual es dosis-dependiente al ser administrados a ratas con diabetes inducida con estreptozotocina por vía oral. El exopolisacárido está compuesto en un 83.5% de carbohidratos y 16.5% de proteínas, presentando 8 diferentes azúcares y 17 aminoácidos. ⁽⁵²⁾

En el estudio realizado por Kim y colaboradores⁽⁵³⁾ en donde estudiaron el efecto hipoglucemiante del cuerpo fructífero de *Lentinula edodes* y denominaron a los compuestos activos como proteínas unidas a polisacáridos. La Tabla 3 muestra otros efectos reportados para este hongo. ^(31,54,55,56,57)

Tabla 3. Compuestos aislados de *Lentinula edodes* y su actividad relacionada.

Basidiomiceto	Compuesto aislado	Efecto
<i>Lentinula edodes</i>	Lentinan (β -D-glucano, lentinina, LEM, eritadenina)	Antidiabético, antifúngico, antimicrobiano e hipocolesterolemiante

Debido a los antecedentes de la actividad biológica de las especies de basidiomicetos que crecen en los países asiáticos y a la gran diversidad de basidiomicetos que crecen en México en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se ha desarrollado una línea de investigación encaminada a la evaluación sistemáticamente la actividad biológica de especies de basidiomicetos que crecen en nuestro país, con el propósito de identificar las especies biológicamente activas como posibles fuentes de sustancias para el desarrollo de nuevos fármacos.

Garza Ocañas et al, llevaron a cabo la evaluación sistémica de extractos acuosos de macromicetos como *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis*, *Ganoderma aplannatum* en donde obtuvieron que estos macromicetos que crecen en el noreste de México no presentan citotoxicidad y además poseen capacidad antioxidante⁽⁵⁸⁾

Tamez de la O et al, evaluaron la actividad antidiabética de cuatro basidiomicetos del noreste de México, siendo el extracto acuoso obtenido de *Lentinus lepideus* el que mostró la mayor actividad hipoglucemiante en un modelo de diabetes experimental con aloxana por lo que se realizó un fraccionamiento biodirigido obteniendo cuatro fracciones (FI, FII, FIII y FIV). Posteriormente, las evaluaciones realizadas con las cuatro fracciones mostraron que la Fracción II a las 6 horas posteriores a su administración presentaba la mayor actividad hipoglucémica. Esta fracción produjo un efecto hipoglucémico similar al observado con glibenclamida, un medicamento hipoglucémico. ⁽⁵⁹⁾

En base a la actividad antidiabética y antioxidante de *Lentinus lepideus* específicamente de la Fracción II obtenida del extracto acuoso, en este estudio se decidió evaluar el posible mecanismo de acción así como determinar si el efecto antioxidante proporciona protección contra el daño oxidativo observado en la diabetes.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que la diabetes mellitus es una de las principales causas de morbi-mortalidad en México y a que el costo de su tratamiento es elevado, la búsqueda de alternativas terapéuticas para este padecimiento constituye un campo de interés creciente.

La Fracción II de *Neolentinus lepideus* demostró tener el mayor efecto antidiabético por lo que es importante determinar el mecanismo por el cual ejerce esta acción, así como determinar si el efecto antioxidante de esta fracción previene o protege del daño producido por el estrés oxidativo generado por la hiperglicemia el cual se ha asociado fuertemente con el desarrollo de las complicaciones de la DM. En base a la actividad biológica de esta fracción, es importante caracterizar el (los) compuesto(s) activo(s) presentes en ella.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el mecanismo por el cual la Fracción II de *Neolentinus lepideus* ejerce su acción antidiabética.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cultivar y obtener la Fracción II de *Neolentinus lepideus*.
2. Evaluar la actividad antidiabética de la Fracción II en ratas.
3. Determinar el mecanismo por el cual la Fracción II ejerce el efecto antidiabético.
4. Determinar la posible protección contra el estrés oxidativo generado por la hiperglucemia.
5. Caracterizar la estructura química de él (los) principios activos presentes en la Fracción II.

CAPÍTULO II

2. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 MATERIAL

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1.1 Material fúngico.

El macromiceto evaluado en este estudio fue obtenido a partir de cultivo de carpóforos frescos de *Lentinus lepideus* el cual actualmente se conoce taxonómicamente como *Neolentinus lepideus* (www.indexfungorum.org), fue recolectado en los bosques templados de coníferas y encinos del municipio de Galeana, N.L. en el año 2001. El hongo fue aislado, clasificado y registrado en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L., campus Linares.

2.1.1.2 Animales.

Se utilizaron ratas Wistar machos de 8 semanas de edad, con un peso promedio de 180 ± 20 g, las cuales fueron obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L. Los animales fueron colocados en jaulas de acrílico con tapa de rejillas metálicas y se mantuvieron a una temperatura de 22 a 24 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con alimentación y agua *ad libitum*.

2.1.2 MATERIAL Y EQUIPO

Algodón

Agitadores magnéticos

Autoclave (*MarkeForgeSterilmatic*)

Balanza analítica (*Mettler-Toledo AB204*)

Balanza granataria(*Mettler-Toledo PB3002*)

Batidora manual (*Braun multiquick*)

Bolsas de celofán de diferentes tamaños

Cajas de Petri desechables (*Fisher*)

Campana de flujo laminar (*Labconco*)

Centrífuga Spinchrone(*Beckman*)

Cinta testigo para autoclave

Cubeta de cuarzo con un trayecto óptico de 1 cm

Embudos de filtración rápida

Equipo de disección

Espectrofotómetro UV-VIS, modelo DU-7500 (*Beckman*)

Frascos de vidrio de 100, 250 y 500 mL(*Pyrex*)

Gasa

Glucómetro (*Accu-check-Performa*)

Gradillas

Guantes desechables (*Protec*)

Hojas para bisturí #22 (*Hergom*)

Jaulas de acrílico con rejillas de metal

Jeringas estériles de 1, 3 y 5 mL(*BD*)

Liofilizador Vir Tis Freeze mobile 12 mod. 6211-0120 (*Labconco*)

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL(*Pyrex*)

Matraces para liofilizar de 150 mL(*Labconco*)

Micropipetas de 10-100, 20-200, 100-1000 y 1000-5000 μ L (*Eppendorf*)

Papel aluminio

Papel filtro número 1 (*Whatman*)

Papelparafilm (*Pechiney Plastic Packaging*)

Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 mL (*Pyrex*)

Pipetas Pasteur de vidrio y desechables (*Kimble*)

Placa de calentamiento con agitador magnético (*Sigma*)

Potenciómetro ø50pHmeter (*Beckman*)

Probetas de 25, 50, 100 y 500 mL (*Pyrex*)

Puntas para micropipetas (*Eppendorf*)

Rotavapor 011 (*Büchi*)

Tiras para determinar glucosa (*Accu-check-Performa*)

Tubos de vidrio de 5 y 10 mL (*Pyrex*)

Tubos para centrífuga (*Corning*)

Vasos de precipitado de 100, 250, 500, 1,000 y 3,000 mL (*Pyrex*)

Vórtex (*American ScientificProducts*)

2.1.3 REACTIVOS

2.1.3.1 Reactivos para el cultivo *in vitro* de los macromicetos.

D-(+) Glucosa (*J.T. Baker*)

Extracto de levadura (*Bioxón*)

Extracto de malta (*Bioxón*)

Agar (*DIFCO*)

Agua destilada

Fosfato de amonio (*Sigma*)

Fosfato de potasio monobásico (*Sigma*)

Sulfato de magnesio heptahidratado (*PQM*)

Cloruro de calcio (*Merck*)

Cloruro férrico (*Sigma*)

Cloruro de sodio (*Sigma*)

Hidrocloruro de tiamina (*Sigma*)

Fosfato de sodio dibásico (*J.T. Baker*)

Ácido cítrico (*PQM*)

2.1.3.2 Reactivos para el fraccionamiento de *Neolentinus lepideus*.

Metanol (*Fermont*)

Agua bidestilada

Hidróxido de sodio (NaOH) al 5% (*Sigma*)

Oxalato de amonio al 1% (*Fermont*)

Ácido acético glacial (*Fermont*)

Etanol (*Fermont*)

2.1.3.3 Reactivos para establecer el modelo de diabetes experimental.

Monohidrato de aloxana (*Aldrich*)

NaCl al 0.9% (*PISA*)

Agua bidestilada

2.1.3.4 Reactivos para la determinación de glucógeno hepático.

Etanol al 80%

Agua bidestilada

Ácido perclórico al 52%

Anthrona

2.1.3.5 Reactivos para la determinación de insulina.

Rat Serum Adipokine (*MILLIPLEX MAP Kit*)

Buffer de ensayo

Suero matriz

Anti-insulin Bead

2.1.3.6 Reactivos para la determinación de glucosa-6-fosfatasa.

Buffer de fosfato (pH 7.4)

Glucosa 6 fosfato 0.1 M y 12.5 mM

EDTA 10 mM

HEPES 8 mM (pH 6.5)

Ácido ascórbico al 10%

Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 5%

Molibdato de amonio al 0.42%

Ácido sulfúrico 0.5 M

2.1.3.7 Reactivos para la determinación de inhibición de la α -glucosidasa.

p-nitrofenil- α -D-glucopiranososa (PNPG) 5 mM

α -glucosidasa 0.1 U/mL

Buffer de fosfato (pH 6.9)

Quercetina

2.1.3.8 Reactivos para la determinación de glutatión (GSH).

Buffer de estabilización

Ácido tricloroacético (TCA)

Buffer de fosfatos 0.5 M (pH 7.1)

EDTA 1 mM

5,5-ditiobis-(2-ácido nitro benzoico) ó DNTB 0.1 mM

2.1.3.9 Reactivos para la determinación de peroxidación lipídica.

Cloruro de potasio (KCl) al 1.15%

Duodecil sulfato de sodio (SDS) al 8.1%

Ácido acético al 20%

Ácido tiobarbitúrico (TBA)

Agua bidestilada

2.1.3.11 Reactivos para la determinación de proteínas.

Albúmina sérica bovina (*Sigma*)

Carbonato de sodio (*Merck*)

Hidróxido de sodio (*Sigma*)

Reactivo de Folin-Ciocalteus (*Sigma*)

Sulfato de cobre (*Sigma*)

Tartrato de sodio y potasio (*Sigma*)

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido.

Se utilizó el medio de Melin-Norkrans modificado, a pH 6.5, con agar bacteriológico para solidificar. El medio fue preparado utilizando por cada litro de solución: 500 mg de extracto de levadura, 3 g de extracto de malta, 10 g de (+)-D-glucosa, 15 de agar, 10 mL de fosfato de amonio, 10 mL de cloruro de calcio, 10 mL de sulfato de magnesio, 10 mL de cloruro de sodio 0.6 mL de cloruro de hierro, 10 mL de tiamina, añadiendo agua bidestilada hasta completar el volumen deseado, una vez terminado se mide el pH y se lleva a 6.5 añadiendo por cada litro 10 mL de fosfato de sodio monobásico y 2 mL de ácido cítrico, el medio de cultivo preparado fue esterilizado durante 15 min y colocado en cajas de Petri estériles en una campana de flujo laminar.

2.2.2 Preparación del medio de cultivo líquido.

El medio de cultivo líquido se preparó igual que el medio sólido, únicamente se eliminó el agar, fue vertido en matraces Erlenmeyer de 500 mL y esterilizado durante 15 min.

2.2.3 Cultivo de los macromicetos en medio sólido.

El cultivo de *Neolentinus lepideus* fue realizado en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar y material estéril. A partir de las cepas puras de *Neolentinus lepideus*, se tomaron muestras del micelio del hongo con hojas de bisturí estéril # 22, las cuales fueron colocadas en cajas de Petri que contenían el medio modificado de Melin-Norkrans, a pH de 6.5. Posteriormente, las cajas fueron selladas con papel parafilm y se incubaron durante 1 mes a 25 °C, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas.

2.2.4 Cultivo de los macromicetos en medio líquido.

El cultivo en medio líquido fue realizado a partir de los macromicetos obtenidos en el medio sólido y en condiciones de esterilidad. Del medio sólido se obtuvieron los inóculos que fueron depositados en matraces Erlen-Meyer de 500 mL que contenían 180 mL de medio modificado de Melin-Norkrans a pH de 6.5. Posteriormente, los matraces fueron sellados con tapones de algodón estériles, papel aluminio y papel parafilm, se etiquetaron e incubaron durante 2 meses a 25 °C, con ciclos luz-oscuridad de 12 h.^(60,61)

2.2.5 Obtención de la biomasa.

Después de dos meses de crecimiento miceliar en medio de cultivo líquido, la biomasa fue recuperada por filtración, se retiró el excedente de agar y se colocó en papel de estraza hasta sequedad, posteriormente, se pesó, se etiquetó y se almacenó en oscuridad, a 25 °C.

2.2.6 Obtención de los extractos metanólicos a partir de la biomasa.

Por cada gramo de biomasa seca y molida del macromiceto *Neolentinus lepideus* se añadieron 30 mL de metanol a temperatura ambiente, se dejó en reposo durante 24 h para la extracción y este proceso fue repetido 3 veces. El extracto metanólico obtenido fue evaporado a presión reducida en un rotavapor a 30 °C.

El extracto recuperado fue liofilizado, pesado, etiquetado y almacenado a 4 °C en oscuridad (Figura 2).

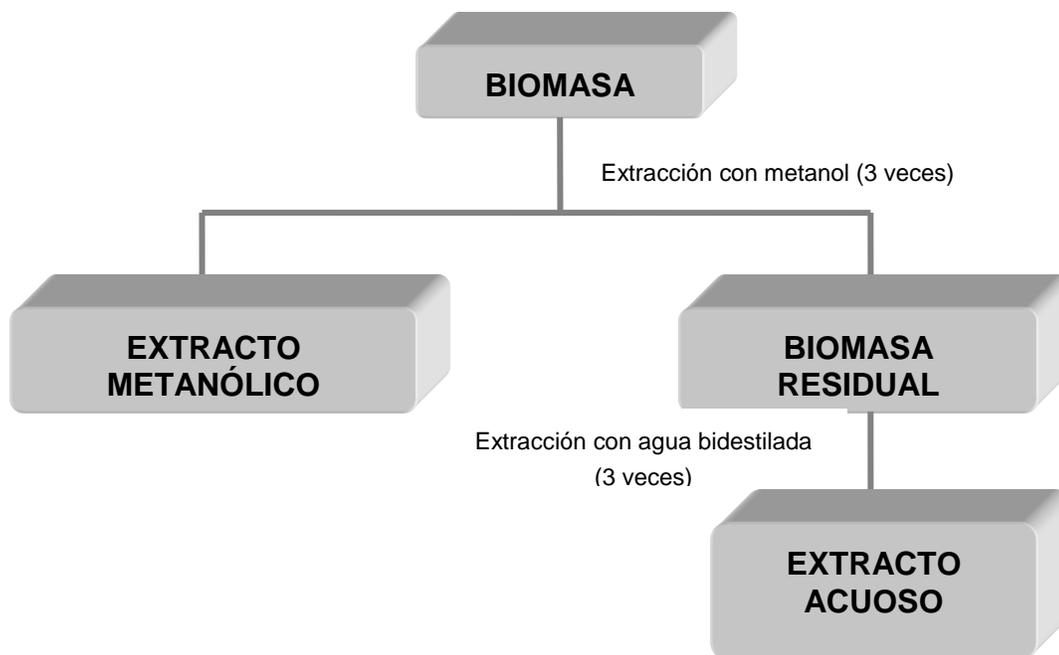


Figura 2. Obtención de los extractos acuosos y metanólicos a partir de la biomasa seca de *Neolentinus lepideus*.

2.2.7 Obtención de los extractos acuosos a partir de la biomasa.

El residuo obtenido después de realizar la extracción metanólica fue colocado en un vaso de precipitado de 4 L y se añadieron 25 mL de agua bidestilada por gramo de residuo. Se dejó en reposo durante 24 h para la extracción y este proceso fue repetido 3 veces. El extracto obtenido fue liofilizado, pesado, etiquetado y almacenado a 4 °C en oscuridad (Figura 2).

2.2.8 Fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso de *Neolentinus leptideus*.

El fraccionamiento de *Neolentinus leptideus* se realizó de acuerdo al método estándar para el fraccionamiento de polisacáridos solubles e insolubles en agua, reportados por Mizuno.⁽⁶²⁾

A partir de un gramo de biomasa seca y molida de *Neolentinus leptideus* se realizaron las extracciones metanólicas y acuosas como se describió anteriormente. El extracto metanólico y el extracto acuoso, ambos se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz.

El residuo que se obtuvo al filtrar el extracto acuoso se colocó en un vaso de precipitado de 4 L y se le añadieron por cada gramo de residuo 25 mL de oxalato de amonio al 1%, se dejó reposar durante 24 h y este proceso fue repetido 3 veces, el extracto obtenido se etiquetó como Fracción II se liofilizó y se almacenó a 4 °C protegido de la luz (Figura 3).

2.2.8 1Precipitación fraccionada.

La precipitación se llevó a cabo por el método descrito por Mizuno.⁽⁶²⁾

2.2.8.2 Obtención de la Fracción II.

Se adicionó un volumen de etanol a 4 °C al residuo obtenido con la extracción de oxalato de amonio al 1%, hasta la formación de un precipitado, el cual se recupero por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

El precipitado se dializó, se liofilizó, se etiquetó como FII y se almacenó a 4 °C protegido de la luz. (Figura 3).

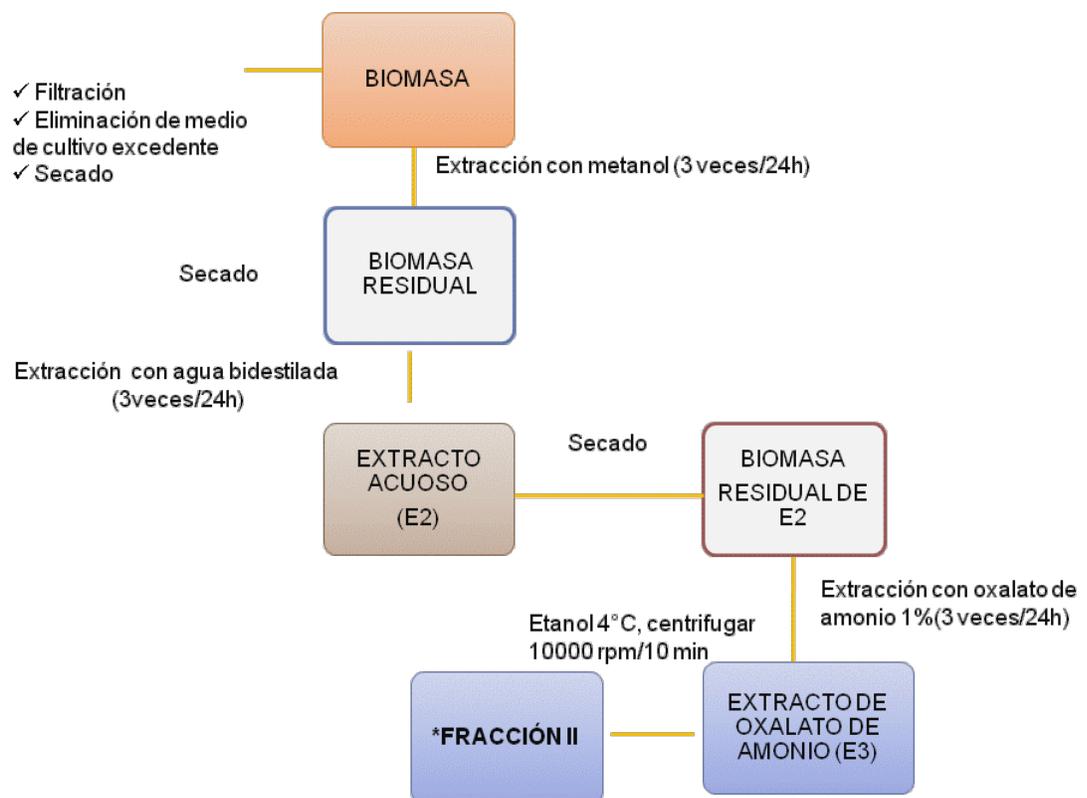


Figura 3. Fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso de *Neolentinus lepideus*.

2.2.9 Evaluación de la actividad antidiabética.

2.2.9.1 Establecimiento del modelo animal de diabetes experimental con aloxana.

Para establecer el modelo de diabetes experimental con aloxana, se utilizaron ratas Wistar machos, de 8 semanas de edad, 180 ± 20 g de peso, las cuales fueron identificadas marcándolas con tinta indeleble. Previo a la administración de la aloxana los animales se mantuvieron en ayuno de 12 horas, se realizó la obtención de muestras de sangre de las venas caudales por punción. Para la realización de la medición de los niveles basales de glucosa se utilizó un equipo portátil *Accu-chekPerforma*®.

Posterior a la medición y registro de los niveles basales de glucosa, se procedió a la administración de la solución de aloxana a dosis de 150 mg/kg, vía intraperitoneal (i.p.) (Figura 4). Las ratas permanecieron en ayuno durante las 8 horas posteriores a cada administración.

A los 7 días posteriores a la administración de aloxana se procedió a realizar medición de los niveles de glucosa y se seleccionaron las ratas para las cuales se logró establecer el modelo de diabetes experimental con aloxana. El criterio establecido para considerar que se había desarrollado la diabetes en los animales fue la detección de niveles de glucosa de 200 mg/dL ó mayores.

Las ratas del grupo control negativo (sanas) recibieron solución fisiológica (0.5 mL) por vía i.p.



Figura 4. Técnica utilizada para la administración de aloxana vía intraperitoneal a ratas Wistar machos.

2.2.9.2 Evaluación del efecto antidiabético y capacidad antioxidante.

Se formaron 4 grupos (n = 8):

Grupo 1, control negativo (ratas sanas). Tratadas con agua destilada.

Grupo 2, ratas diabéticas. Tratadas con agua destilada.

Grupo 3, ratas diabéticas. Tratadas con la Fracción II.

Grupo 4, ratas diabéticas. Tratadas con Glibenclamida.

Los cuatro grupos recibieron el tratamiento durante los 21 días posteriores al establecimiento de la diabetes.

Los grupos formados y dosis utilizadas para la administración de la Fracción II se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Grupos de estudio.

GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS
1	Control negativo (agua destilada)	0.5 mL
2	Diabéticas sin tratamiento (agua destilada)	0.5 mL
3	Fracción II	200 mg/kg
4	Glibenclamida	5 mg/kg

2.2.9.3 Administración de los diferentes tratamientos a las ratas diabéticas.

Previo a la administración de los diferentes tratamientos, los animales fueron mantenidos en ayuno durante 8 horas. Posteriormente, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal y se les realizó la determinación de los niveles basales de glucosa con ayuda de un glucómetro comercial *Accu-chekPerforma®*.

La Fracción II y la Glibenclamida fueron diluidas en solución fisiológica, a la dosis establecida y se administraron por sonda orogástrica (Figura 5).

A las ratas del grupo del control negativo y diabéticas sin tratamiento se les administró solución fisiológica.

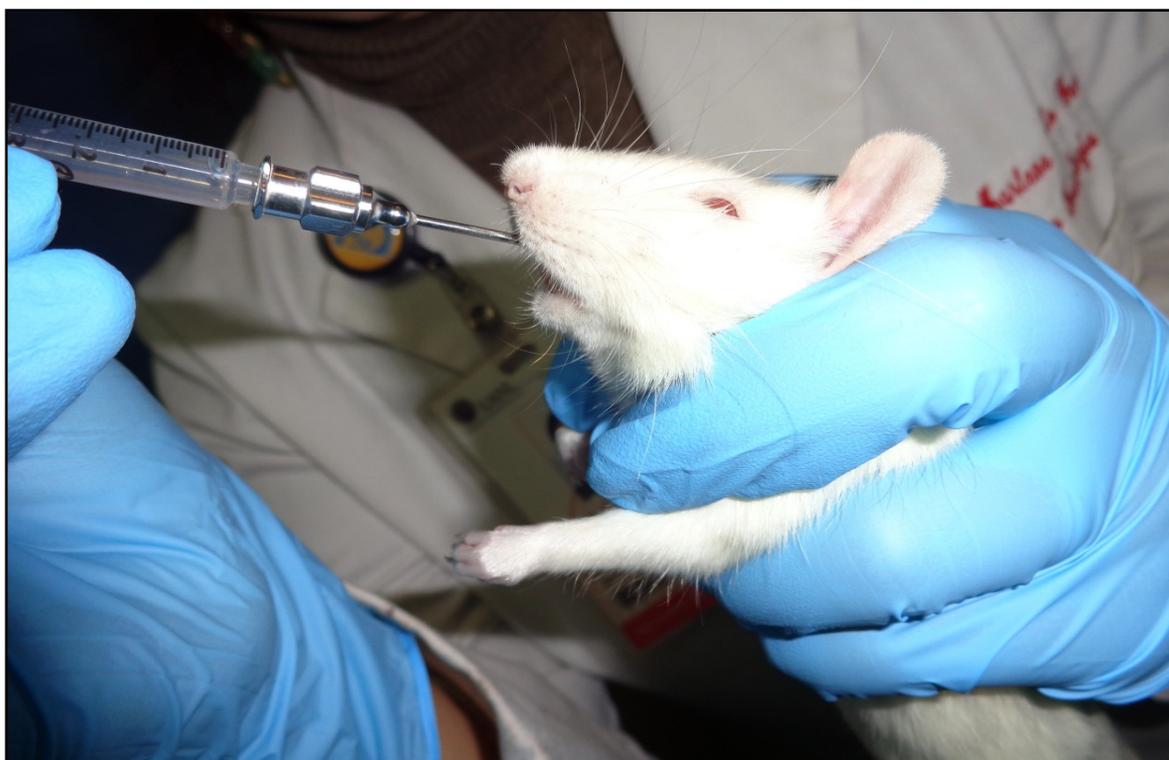


Figura 5. Técnica utilizada para la administración de los diferentes tratamientos por sonda orogástrica a ratas wistar machos.

2.2.9.4 Esquema de administración de los tratamientos.

Los diferentes tratamientos fueron administrados diariamente durante 21 días, entre las 8 y 10 horas.

2.2.9.5 Medición de niveles plasmáticos de glucosa.

Las mediciones de los niveles plasmáticos de glucosa se realizaron en los días 1, 7, 14 y 21.

La glucosa fue determinada previo a la administración de cada tratamiento (nivel basal), y a las 4 horas posteriores a la administración del mismo (Figura 6).



Figura 6. Técnica utilizada para la medición de glucosa en sangre de la vena caudal de la rata.

2.2.10 Obtención de muestras.

A los 21 días de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una solución de pentobarbital sódico a una dosis de 0.1 mL/kg administrado vía i.p. y se colectaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca en tubos rojos al vacío, sin anticoagulante. Todas las muestras de sangre se mantuvieron a una temperatura de 4°C para su conservación.

Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se disecaron los siguientes órganos: hígado, páncreas, así como ambos riñones. Se tomaron biopsias de los órganos obtenidos y las cuales fueron colocadas en frascos estériles con formaldehído para su análisis histopatológico.

Los órganos fueron perfundidos *in situ* con una solución fría de NaCl al 0.9% para eliminar los restos de sangre. Los órganos fueron pesados, etiquetados y congelados inmediatamente.

Una parte del hígado y de riñón fueron homogeneizadas con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M y cloruro de sodio al 0.9 % a pH 7.4 en una proporción 1:4 (p/v). El homogéneo fue alicatado en tubos pepenador los cuales se mantuvieron almacenados a una temperatura de -20°C hasta su utilización.

2.2.11 Determinación de niveles de insulina en sangre.

Las muestras de sangre se colocaron en tubos sin anticoagulante, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero. Los niveles séricos de insulina fueron medidos por inmunoensayo empleando un kit MILLIPLEX® (*MilliporeCorporation*) utilizando el sistema Luminex 200, éste utiliza técnicas con microesferas marcadas internamente con un código de color con dos colorantes fluorescentes recubiertos con un anticuerpo de captura específico.

Después de que un analito de una muestra de ensayo es captado, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. La mezcla de reacción se incuba a continuación con el conjugado estreptavidina-PE, para completar la reacción en la superficie de cada microesfera. Las microesferas pasan a través de un láser que excita los colorantes internos que las marcan. Un segundo láser excita PE, emitiendo un tinte fluorescente en la molécula informadora. ⁽⁶³⁾

2.2.12 Determinación de glucógeno.

La concentración de glucógeno fue determinada en el homogenado de hígado de acuerdo al método de Seifter. ⁽⁶⁴⁾ En este método la cantidad de producto formado es proporcional a la concentración de glucógeno, la cual es medida por incremento de absorbancia a 630 nm.

2.2.12.1 Solución estándar de glucosa.

Se utilizó una solución estándar de glucosa a una concentración del 1%.

2.2.12.2 Curva de calibración.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración en un rango de 10 a 50 μg de glucosa. Se utilizó un blanco de agua destilada, el cual fue procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de los reactivos utilizados se describen en la Tabla 5. Cada estándar fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para realizar la curva de calibración.

Tabla 5. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de glucógeno.

Curva de calibración	Concentración	Solución stock glucosa (mL)	Agua destilada (mL)	Enfriar 5 min	Antrona (mL)
Blanco	0	0	2	Sí	4
1	10	0.2	1.8	Sí	4
2	20	0.4	1.6	Sí	4
3	30	0.6	1.4	Sí	4
4	40	0.8	1.2	Sí	4
5	50	1	1.0	Sí	4
6	100	2	0	Sí	4

2.2.12.3 Procedimiento.

El tejido hepático fue homogeneizado en etanol caliente al 80% a razón de 0.1 g/mL. Posteriormente, se centrifugó a 9,500 rpm durante 20 min y se recolectó el residuo.

El residuo fue lavado y extraído a 0°C durante 20 min con una mezcla de 5mL de agua y 6mL de ácido perclórico al 52%. Nuevamente centrifugó a 9,500 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante.

Se tomaron 0.2 mL de sobrenadante, se las añadió 0.8 mL de agua destilada y se agitaron en vórtex. Finalmente se añadieron 4mL de antrona y los tubos fueron colocados en baño de agua caliente durante 8 min.

Después de la incubación, los tubos se pasaron a un baño de hielo durante 8 min. Finalmente se leyó su absorbancia a 630 nm.

2.2.12.4 Cálculos.

La concentración de glucógeno de las muestras fue interpolada de la curva de calibración, los valores obtenidos fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).

2.2.13 Determinación de glucosa-6-fosfatasa.

La actividad de glucosa-6-fosfatasa fue determinada en alícuotas de homogenados de hígado por el método de Harper.⁽⁶⁵⁾ Se expresa como nmoles de fosfato inorgánico liberado/g de tejido.

2.2.13.1 Solución estándar de fosfato de potasio monobásico.

Se utilizó una solución estándar de KH_2PO_4 a una concentración de 1 mM.

2.2.13.2 Curva de calibración.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de KH_2PO_4 con un contenido de 12 a 50 μg de fosfato. Se utilizó un blanco de agua destilada el cual fue procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de los reactivos utilizados se describen en la Tabla 6. Cada estándar fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para realizar la curva de calibración.

Tabla 6. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de glucosa-6-fosfatasa.

Curva de calibración	Solución stock KH_2PO_4 (μL)	Agua destilada (μL)	Solución de parada (μL)
Blanco	0	100	900
1	12	88	900
2	25	75	900
3	37	63	900
4	50	50	900

2.2.13.3 Procedimiento.

Preparación del homogenado.

Al homogenado de hígado se le añadieron 3 mL de sacarosa 0.32M disuelta en MgCl_2 3mM, se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos, el precipitado se fue resuspendido en una solución que contenía sacarosa 0.25 M, MgCl_2 1 mM y HEPES 5mM a pH de 6.5 a razón de 1mL/g de hígado.

Posteriormente se tomaron 20 μL del preparado anterior, 900 μL de solución de parada y se dejó desarrollar el color durante 20 min a 45 °C. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 820 nm.

2.2.14 Inhibición de la alfa-glucosidasa.

La actividad enzimática de la α -glucosidasa se determinó colorimétricamente, evaluando la liberación de 4-nitrofenol del 4-p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (PNPG).⁽⁶⁶⁾

La Fracción II fue disuelta en agua destilada hasta obtener diferentes diluciones. Posteriormente, las diferentes diluciones fueron incubadas con 250 μ L α -glucosidasa 0.1 U/mL a 37°C por 5 min. Posteriormente se adicionaron 125 μ L de PNPG y se realizó otra incubación a 37 °C por 30 min. Finalmente se añadió 1 mL de Na₂CO₃0.1 M para detener la reacción.

El control negativo se prepara adicionando buffer de fosfatos en lugar de la muestra a evaluar. El control positivo se realiza con la quercetina. El blanco se prepara adicionando el buffer de fosfatos en lugar de la α -glucosidasa. Se midió la absorbancia a 405 nm.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente ecuación (donde DO = dispersión óptica):

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{[(\text{DO control negativo} - \text{DO blanco}) - (\text{DO muestra} - \text{DO control positivo})]}{(\text{DO control negativo} - \text{DO blanco})} \times 100$$

La CI_{50} (concentración inhibitoria 50) se define como la concentración que causa el 50% de inhibición de la α -glucosidasa.

2.2.15 Determinación de los niveles de glutatión.

El GSH fue determinado en homogeneizados de hígado y riñón, mediante el método espectrofotométrico descrito por Ellman⁽⁶⁷⁾ que se basa en la medición de la absorbancia del ácido-5-tio-2-nitrobenzoico a 412 nm.

2.2.15.1 Solución estándar de glutatión.

Se preparó una solución de GSH a una concentración de 100 μ g/mL. El GSH fue disuelto en una solución fría de ácido metafosfórico al 3% y se preparó en forma previa a la realización de las determinaciones ya que es inestable.

2.2.15.2 Curva de calibración.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de GSH con un contenido de 0.5 a 25 μ g de GSH. Se utilizó un blanco con agua destilada procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de cada reactivo empleadas para la preparación de la curva de calibración se describen en la Tabla 7. Cada estándar fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para realizar la curva de calibración.

Tabla 7. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de glutatión.

Curva de calibración	Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M (mL)	EDTA (µL)	Ácido metafosfórico (µL)	Solución stock de glutatión (µL)	DNTB (µL)
Blanco	2.5	800	200	0	30
1	2.5	800	195	5	30
2	2.5	800	190	10	30
3	2.5	800	150	50	30
4	2.5	800	100	100	30
5	2.5	800	0	200	30
6	2.5	800	0	250	30

2.2.15.3 Procedimiento.

Se colocaron 500mL del homogenado en tubos sobre hielo. A cada tubo se le agregó 1 mL de solución amortiguadora de solubilización. Los tubos se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar 15 min. Posteriormente, se les adicionó 1 mL de TCA al 5% y se agitaron nuevamente en el vórtex durante 5 min. Finalmente, la muestra se centrifugó a 6,000 rpm a 4°C durante 15 min. El sobrenadante fue utilizado para realizar las mediciones.

A 200 µL del sobrenadante se le agregaron 2.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, 800 µL de EDTA y 30 µL del reactivo de

Ellman (DNTB). Las muestras se agitaron en vórtex durante 20 segundos y la absorbancia de los estándares de la curva de calibración y de las muestras fue leída a 412 nm. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

2.2.15.4 Cálculos.

La concentración de glutatión de las muestras fue interpolada de la curva de calibración, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-Vis Beckman DU-7500). Los valores de glutatión se reportaron en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

2.2.16 Determinación de los niveles de peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos fue determinada en hígado y riñón mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico descrita por Mihara.⁽⁶⁸⁾ La técnica se basa en la lectura espectrofotométrica de la absorbancia del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) a 532 nm.

2.2.16.1 Solución estándar de malondialdehído (MDA).

Se preparó una solución del 1,1,3,3-tetraetoxipropano a una concentración de 40 nmol de MDA/mL. Esta solución fue empleada para la preparación de los estándares de la curva de calibración.

2.2.16.2 Curva de calibración.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de MDA a una concentración de 0.8 a 16 nmoles/mL. Cada punto de la curva se midió por triplicado y el promedio de estos valores fue utilizado para graficar la curva de calibración. Las cantidades de los estándares empleadas para la realización de la curva de calibración se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de peroxidación de lípidos

Curva de calibración MDA	MDA (mL)	SDS 8.1 % (µL)	Ácido acético 20% (mL)	TBA 0.8% (mL)	Agua destilada (µL)
Blanco	0	200	1.5	1.5	800
1	20	200	1.5	1.5	780
2	50	200	1.5	1.5	750
3	100	200	1.5	1.5	700
4	200	200	1.5	1.5	600
5	400	200	1.5	1.5	400

2.2.16.3 Procedimiento.

A 100 µL del homogeneizado se le adicionaron 200 µL de SDS al 8.1%, 1.5 mL de ácido acético al 20%, 1.5 mL de TBA al 0.8% y 700 µL de agua. Las muestras se colocaron en un baño de agua a 95°C durante 1 hora.

Posteriormente se enfriaron en baño de hielo y se les adicionó 1 mL de agua destilada. Por último, las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min. La capa orgánica fue utilizada para medir la absorbancia a 532 nm. Los estándares de la curva de calibración y el blanco fueron procesados bajo las mismas condiciones que las muestras.

2.2.16.4 Cálculos.

La concentración de malondialdehído de las muestras fue interpolada de la curva de calibración, los valores fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500). Los valores de lípido-peroxidación se expresaron en nmoles de MDA/mg de proteína.

2.2.17 Determinación de proteínas por el método de Lowry.

La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo al método de Lowry ⁽⁶⁹⁾ donde la cantidad de producto formado depende de la concentración de proteína. Por lo tanto, un incremento de absorbancia a 750 nm es proporcional al incremento en la concentración de proteínas.

2.2.17.1 Solución estándar de albúmina.

Se utilizó una solución estándar de albúmina bovina a una concentración de 100 µg/mL. La albúmina fue disuelta en agua destilada.

2.2.17.2 Curva de calibración.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración con estándares de albúmina en un rango de 12.5 a 100 µg de proteína. Se utilizó un blanco de agua destilada procesado bajo las mismas condiciones que los estándares. Las cantidades de los reactivos utilizados se describen en la Tabla 9. Cada estándar fue preparado por triplicado y el promedio de sus lecturas fue utilizado para graficar la curva de calibración.

Tabla 9. Concentraciones utilizadas en la curva de calibración para la determinación de proteínas.

Curva de calibración	Solución stock albúmina (mL)	Agua destilada (mL)	Solución C (mL)	Folin (mL)
Blanco	0	1	5	0.5
1	0.125	0.875	5	0.5
2	0.250	0.750	5	0.5
3	0.5	0.5	5	0.5
4	1	0	5	0.5

2.2.17.3 Procedimiento.

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de la muestra diluida (1:1000) más 5 mL de solución C (Apéndice I), se agitó en vórtex. Esta muestra se dejó reposar durante 15 min y posteriormente se le adicionaron 0.5 mL del reactivo

de Folin - Ciocalteus, se agitó nuevamente en vórtex. Se dejó reposar 20 min y se midió la absorbancia a 750 nm. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

2.2.17.4 Cálculos.

La concentración de proteínas de las muestras fue interpolada de la curva de calibración, los valores obtenidos fueron ajustados con el método de mínimos cuadrados (programa estadístico del espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-7500).

2.2.18 Análisis morfológico.

El análisis morfológico fue realizado siguiendo el procedimiento descrito por Kolmer.⁽⁷⁰⁾

Las muestras se fijaron en formaldehído al 10%, posteriormente se deshidrataron en soluciones crecientes de alcohol del 70, 80, 95% hasta llegar al alcohol absoluto, durante 12 horas en cada solución. Al finalizar la deshidratación de las muestras se realizó su aclarado con una solución de alcohol etílico y aceite de cedro en partes iguales. Posteriormente, fueron colocadas en aceite de cedro, ambos procesos fueron realizados durante 12 h cada uno.

Después del aclarado se procedió a una infiltración con aceite de cedro y parafina en partes iguales durante 12 horas, al finalizar se realizaron dos baños de parafina a punto de fusión (56 - 58°C), durante 8 h cada baño. Las

muestras fueron añadidas a parafina fundida en cajitas de papel. Cuando la parafina se solidificó, las cajas se llevaron a agua con hielo, se les quitó el papel y se emparejaron los lados. Después se colocaron los bloques sobre un eje metálico caliente, una vez adherido se sumergió en agua con hielo hasta realizarlos cortes de 5 a 10 micras. Se realizaron los cortes con el micrótopo, con la cuchilla previamente fría, formando cintas de parafina, las cuales se colocaron en agua a 45 °C.

Los cortes fueron separados y colocados en portaobjetos calientes, cubiertos de solución albuminosa de Mayer. Los portaobjetos se calentaron y se dejaron escurrir, se colocaron en una estufa a 60°C por una hora y se dejaron enfriar.

Tinción con hematoxilina y eosina.

Los portaobjetos fueron colocados en alcohol etílico al 80% y después en alcohol absoluto. Al finalizar fueron cubiertos con unas gotas de una solución alcohol-éter en partes iguales y se les puso una gota de celoidina al 0.05%.

Se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 15 a 20 segundos o hasta que los cortes quedaron de color azul. Se lavaron con agua, posteriormente, se sumergieron en ácido clorhídrico al 1% durante 2-5 segundos o hasta que los cortes quedaron rojos. Se lavaron con agua, se trataron brevemente con hidróxido de amonio al 0.1% hasta que lo cortes

volvieron a quedar de color azul y nuevamente se lavaron con agua. Finalmente se tiñeron en contraste con una solución concentrada de eosina durante 10 a 20 segundos y se lavaron con agua.

Al finalizar este proceso, las muestras fueron deshidratadas con baños de alcohol en concentración creciente 80, 95 y 100%, durante 15-20 segundos por baño. Una vez concluida la deshidratación las muestras fueron sumergidas en xilol durante 15 segundos y se montaron en el bálsamo.

2.2.19 Caracterización química.

Prueba de fenol-acido sulfúrico.

Esta prueba se basa en la reacción de los carbohidratos con fenol en presencia de ácido sulfúrico concentrado, para formar un complejo coloreado amarillo marrón que puede ser leído a 490 nm.⁽⁷¹⁾

Hidrólisis ácida.

Para la caracterización de la Fracción II se llevó a cabo una hidrólisis con 1.5 g de Fracción II a la cual se le agregaron 25 mL de ácido tricloroacético (TCA) 2M a 100°C y se mantuvo durante 12 horas en un sistema

de reflujo. Pasado este tiempo se dejara evaporar el TCA y se agregaran 5 mL de metanol.

Se pesaron 500 mg del hidrolizado obtenido y se purificaron mediante separación en columna, utilizando sílica gel 100 C18 en fase reversa para obtener fracciones de 10 mL y utilizando un sistema metanol-agua: H₂O 95:5,90:10,85:15,80:20 y 75:25. Las muestras de interés se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H).

2.2.20 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como las medias \pm SD de ocho experimentos (n = 8). El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni con previo análisis de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados fueron analizados utilizando el programa SPSS versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL). Un valor de p <0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1 Material fúngico.

La Figura 7 muestra el aspecto del esporoma de *Neolentinus lepideus*, clasificado taxonómicamente y registrado en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L., campus Linares.



Figura 7. Aspecto del carporforo *Neolentinus lepideus*. Fotografía tomada de nature lexikon .com

3.1.2 Cultivo *in vitro* de *Neolentinus lepideus* en medio sólido.

En la Figura 8 se muestra el aspecto del crecimiento micelial de *Neolentinus lepideus* en medio sólido de Mellin-Norkrans a pH de 6.5, incubado a 25°C, durante un periodo de 3 a 4 semanas.

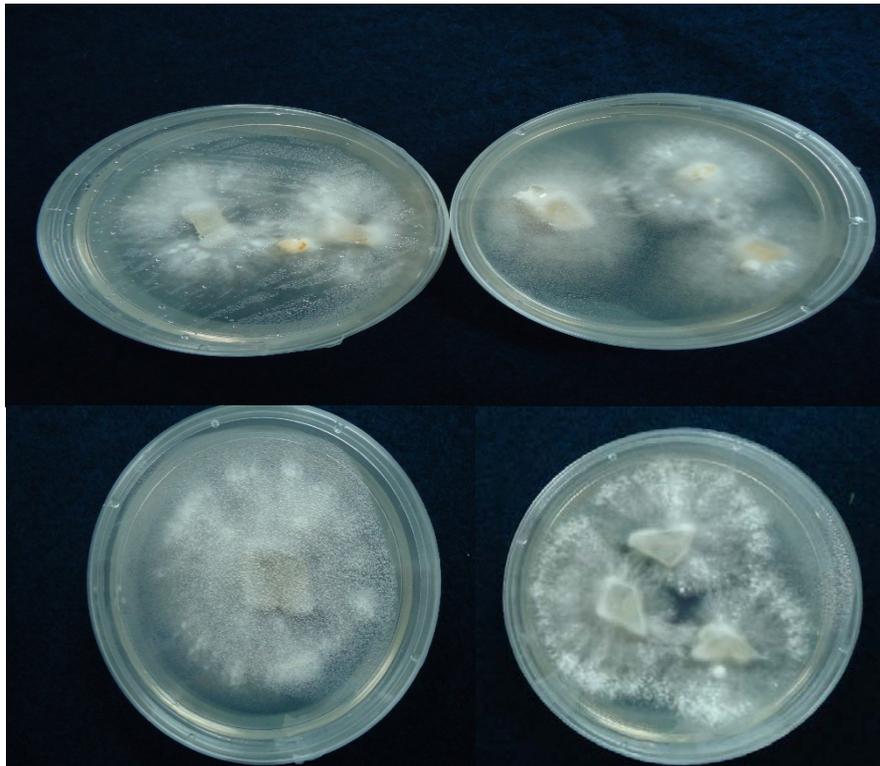


Figura8.Diferentes aspectos del crecimiento micelial de *Neolentinus lepideus* en medio sólido.

3.1.3 Cultivo de *Neolentinus lepideus* en medio líquido.

En la Figura 9 se muestra el aspecto del crecimiento micelial de *Neolentinus lepideus* en medio líquido de Mellin-Norkrans a pH de 6.5 incubado a 25 °C en un periodo de 2 meses.

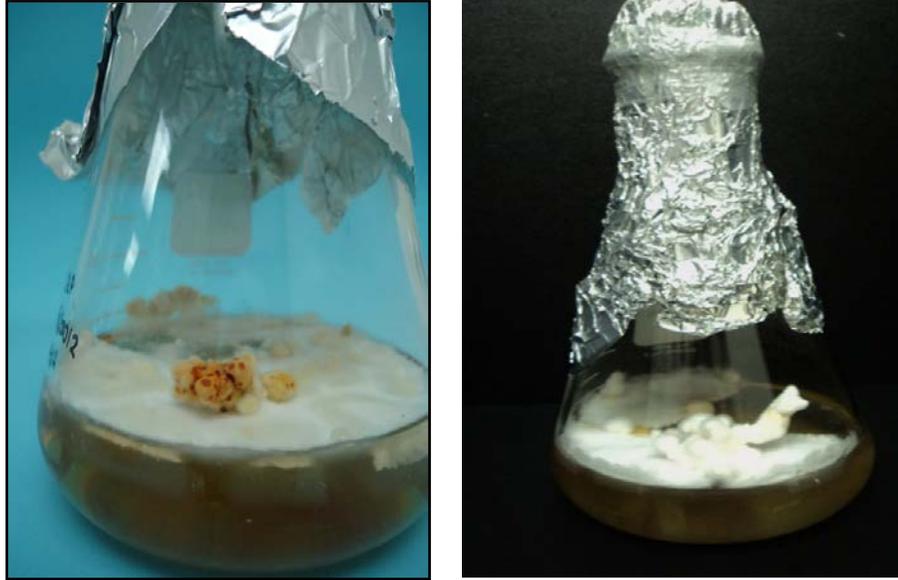


Figura 9.Aspecto del cultivo de *Neolentinus lepideus* en medio líquido mostrando formación de primordios.

3.1.3 Obtención de biomasa de *Neolentinus lepideus*.

En la Figura 10 se muestra el aspecto de la biomasa filtrada de *Neolentinus lepideus*, obtenida al después de 2 meses de incubación en medio líquido a 25 °C.



Figura 10. Aspecto de la biomasa filtrada obtenida de *Neolentinus lepideus*.

3.1.4 Obtención de extractos acuosos de *Neolentinus lepideus*.

Las extracciones acuosas se realizaron a partir de la biomasa seca y molida de *Neolentinus lepideus*.

En la Tabla 10 se muestran las cantidades obtenidas y el porcentaje de recuperación de extractos acuosos a partir de 1 g de biomasa seca de *Neolentinus lepideus*.

Tabla 10. Miligramos (mg) y porcentaje de recuperación de extractos acuosos.

Extractos acuoso	Cantidad obtenida(mg)	Recuperación (%)
<i>Neolentinus lepideus</i>	156 ± 5	15.8

3.1.5 Fraccionamiento biodirigido de *Neolentinus lepideus*.

Se realizó el fraccionamiento del extracto acuoso de *Neolentinus lepideus* y la Fracción II (FII) se obtuvo por extracción con oxalato de amonio. La cantidad obtenida a partir de un gramo de biomasa seca y el porcentaje de recuperación se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Cantidad obtenida (mg) y % de recuperación de la Fracción II de *Neolentinus lepideus*.

	Cantidad obtenida(mg)	Recuperación (%)
Fracción II	138.36 ±0.08	13.83

3.2 Evaluación de la actividad antidiabética de la Fracción II obtenida de *Neolentinus lepideus*.

Los niveles glucosa sanguínea medida 4 horas después de haber administrado el tratamiento muestran que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de las ratas diabéticas que no recibieron tratamiento y los de las ratas que recibieron la Fracción II o Glibenclamida. Asimismo, hubo diferencia significativa entre las ratas diabéticas tratadas con la Fracción II y las tratadas con Glibenclamida (control positivo).

La Tabla 12 muestra el porcentaje de reducción de los niveles de glucosa sanguínea, la cual fue medida 4 horas después de haber administrado los diferentes tratamientos. En los días 1, 7 14 y 21.

Tabla 12. Porcentaje de reducción de glucosa en los diferentes grupos de estudio.

Grupo	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
Diabéticas sin tratamiento	4.28 ± 2.76	5.15 ± 3.0	6.2 ± 4.15	5.3 ± 4.63
Diabéticas + Fracción II	24.5 ± 6.8*	30.23 ± 10.8*	31.37 ± 9.06*	28.81 ± 8.71*
Diabéticas + Glibenclamida	28.2 ± 7.87*	31.7 ± 9.56*	29.4 ± 9.55*	26.19 ± 9.19*

Los datos representan el promedio ± D.E. expresado en %, n=8.

La Figura 11 muestra los niveles de glucosa de los diferentes grupos de estudio. La glucosa fue medida los días 1, 7, 14 y 21 de tratamiento.

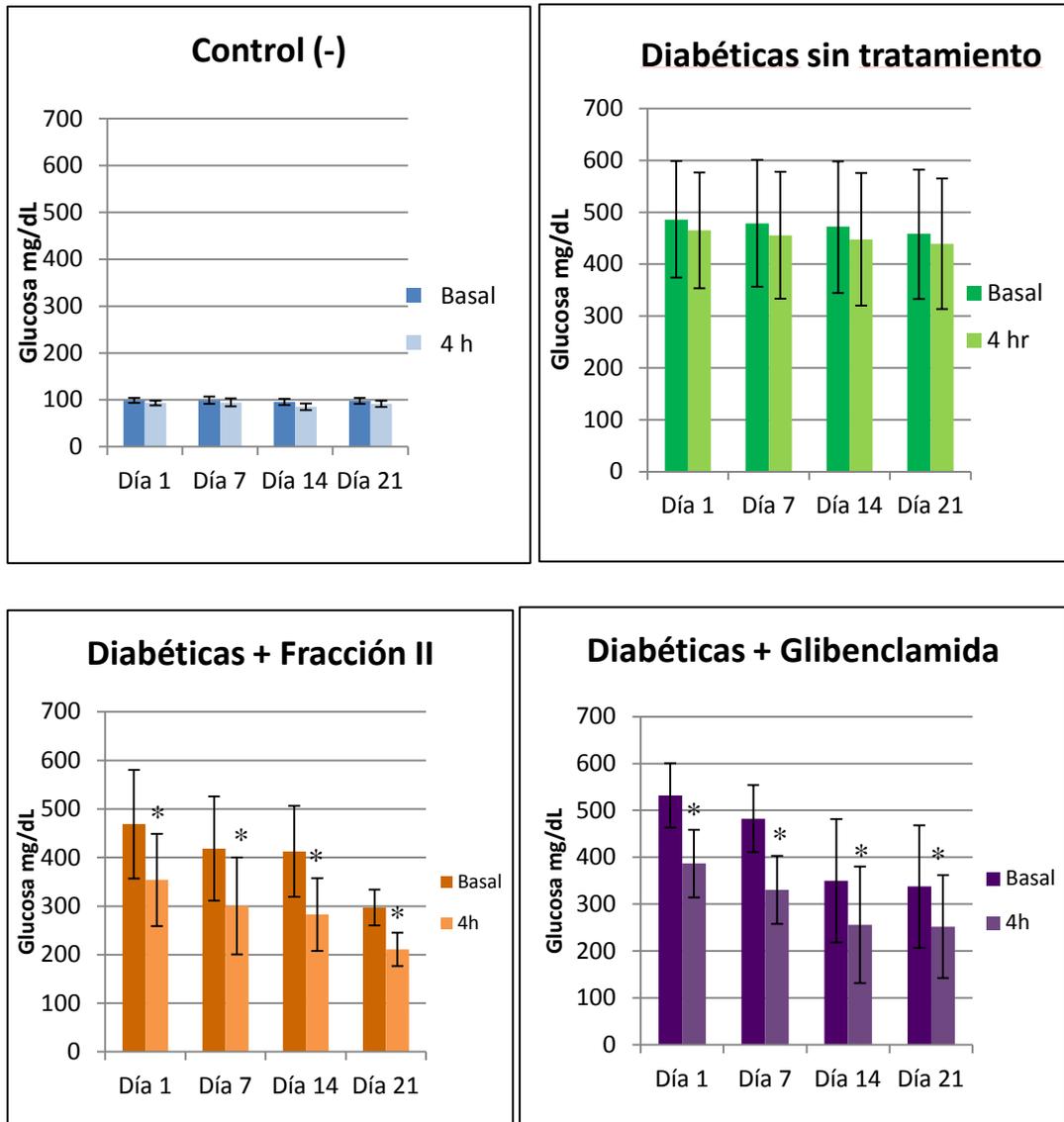


Figura 11. Niveles de glucosa (mg/dL.) en los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio \pm D.E. n=8 *p<0.05

Las ratas de los diferentes grupos experimentales fueron pesadas los días en que les fue tomada la glicemia. Los resultados obtenidos mostraron que las ratas tratadas con la Fracción II perdieron menos peso que aquellas tratadas con Glibenclamida o las ratas sin tratamiento.

La mayor pérdida de peso se observó en las ratas sin tratamiento. Las ratas tratadas con Glibenclamida no tuvieron diferencias significativas de peso a lo largo del estudio.

La Tabla 13 muestra el peso promedio de los diferentes grupos experimentales en los días 1, 7, 14 y 21 mientras que en la Figura 13 se muestra la representación gráfica de los resultados.

Tabla 13. Promedio de peso corporal por grupo de estudio.

Grupo	Día1	Día 7	Día 14	Día 21
Control (-)	195.5 ± 10	208.5 ± 10*	219.6 ± 8	230.6 ± 9*
Diabéticas sin tratamiento	196.30 ± 11	186 ± 9	177.2 ± 9	166.6 ± 8
Diabéticas + Fracción II	202.75 ± 13	198 ± 16*	203.88 ± 18*	212.5 ± 18*
Diabéticas + Glibenclamida	190.88 ± 19	184 ± 19	179.88 ± 27	172 ± 33

Los datos representan la media ± D.E., expresado en gramos. n =8

La Figura 12 muestra los promedios de peso corporal de las ratas de los diferentes grupos de estudio tomado los días 1, 7, 14 y 21 de tratamiento

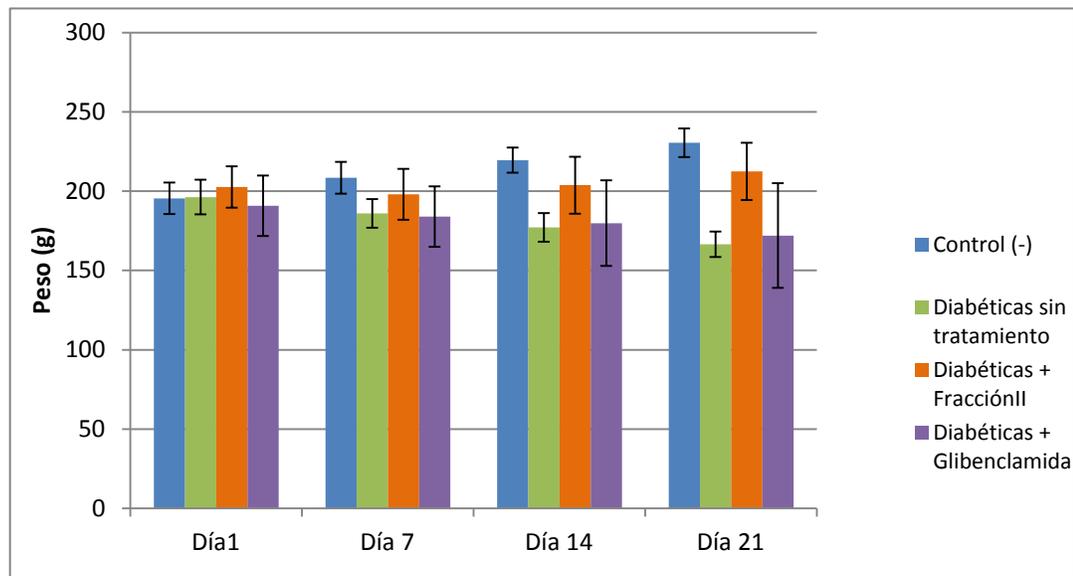


Figura 12. Peso corporal (g) de los animales al inicio y al término del estudio. Los datos representan el promedio \pm D.E. $n=8$ * $p<0.05$

3.3 Determinación de niveles de insulina en sangre.

Los resultados de la determinación de los niveles de insulina mostraron que la Fracción II estimula la liberación de insulina en las ratas diabéticas en forma semejante a la Glibenclamida, que es un fármaco que tiene como mecanismo de acción su liberación.

Asimismo existe una diferencia significativa entre las ratas tratadas con la Fracción II y las tratadas con Glibenclamida en comparación con las ratas

diabéticas. La Tabla 14 muestra las concentraciones promedio de insulina de los diferentes grupos de estudio medidos el día 21 de tratamiento (día en que se concluyó el estudio).

Tabla 14. Secreción de insulina en los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.

Grupo	Niveles de insulina (ng/mL)
Control (-)	1.37 ± 0.26*
Diabéticas sin tratamiento	0.099 ± 0.09
Diabéticas + Fracción II	0.56 ± 0.21*
Diabéticas + Glibenclamida	0.66 ± 0.21*

Los datos representan la media ± D.E., n=8 *p<0.05

La Figura 13 muestra los niveles de insulina de los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.

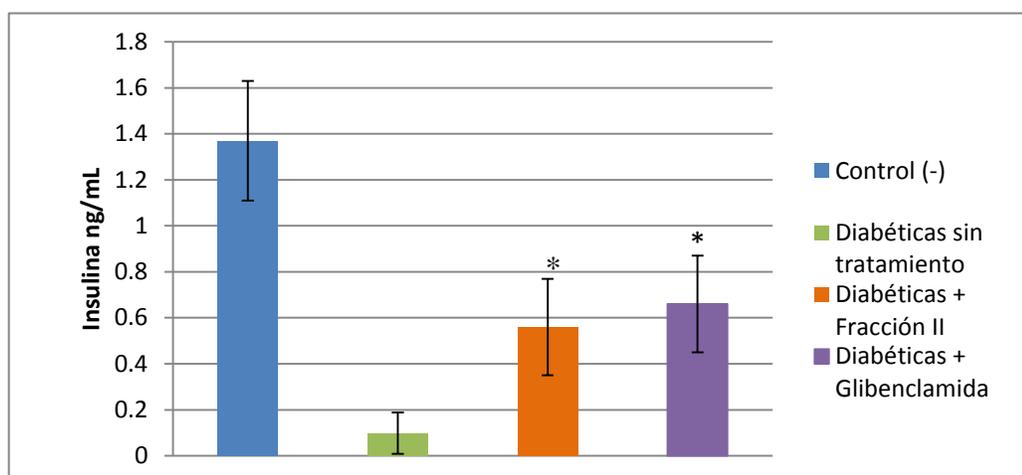


Figura 13. Niveles de insulina en sangre (ng/mL). En los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio ± D.E. n =8 *p<0.05

3.4 Determinación de glucógeno.

La Tabla 15 muestra los niveles de glucógeno hepático en los diferentes grupos experimentales. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de glucógeno de grupos tratados con la Fracción II o la Glibenclamida en comparación con el grupo de ratas sanas y de ratas diabéticas sin tratamiento.

Tabla 15. Niveles de glucógeno hepático de los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.

Grupo	Glucógeno mg/mL
Control (-)	0.0160 ± 0.0051
Diabéticas sin tratamiento	0.0128 ± 0.0023
Diabéticas + Fracción II	0.0833 ± 0.0164*
Diabéticas + Glibenclamida	0.0846 ± 0.0128*

Los datos representan la media ± D.E., n=8 *p<0.05

Los resultados obtenidos en la determinación de glucógeno en los diferentes grupos de estudio el día 21 de tratamiento se muestran en la Figura 14.

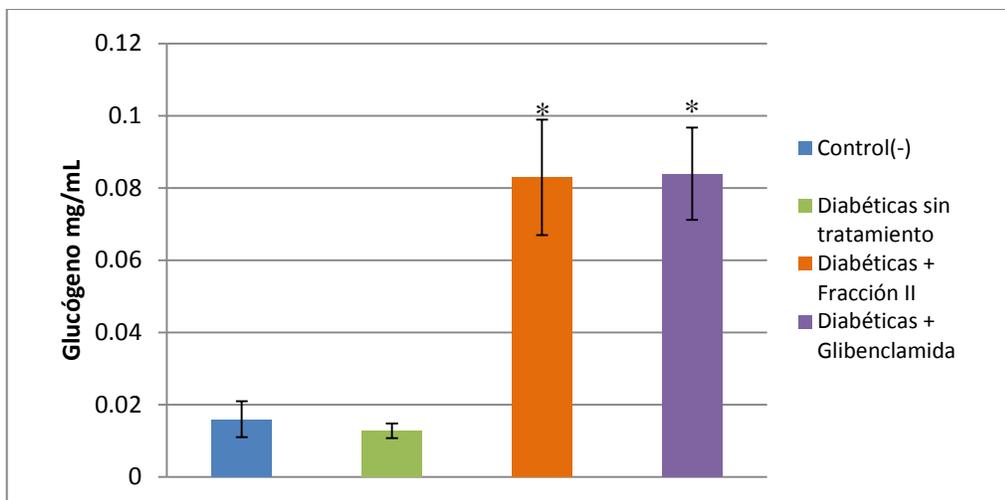


Figura 14. Niveles de glucógeno hepático (mg/mL) en los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio \pm D.E. n=8 *p<0.05

3.5 Determinación de glucosa-6-fosfatasa.

La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos en la determinación de la glucosa-6-fosfatasa hepática, donde se observa que las ratas tratadas con la Fracción II o con Glibenclamida liberan una menor cantidad de pirofosfato que las ratas diabéticas sin tratamiento, es decir que la glucosa-6-fosfatasa presenta una menor actividad en la degradación del glucógeno. Los resultados son estadísticamente significativos.

Tabla 16. Actividad de la glucosa-6-fosfatasa en el día 21 de tratamiento.

Grupo	Glucosa-6-fosfatasa nmoles/mg Pi liberado
Control (-)	1.82 ± 0.58*
Diabéticas sin tratamiento	15.31 ± 2.42
Diabéticas + Fracción II	8.91 ± 2.25*
Diabéticas + Glibenclamida	8.06 ± 2.68*

Los datos representan la media ± D.E., n=8 *p<0.05

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos en la determinación de glucosa-6-fosfatasa de los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.

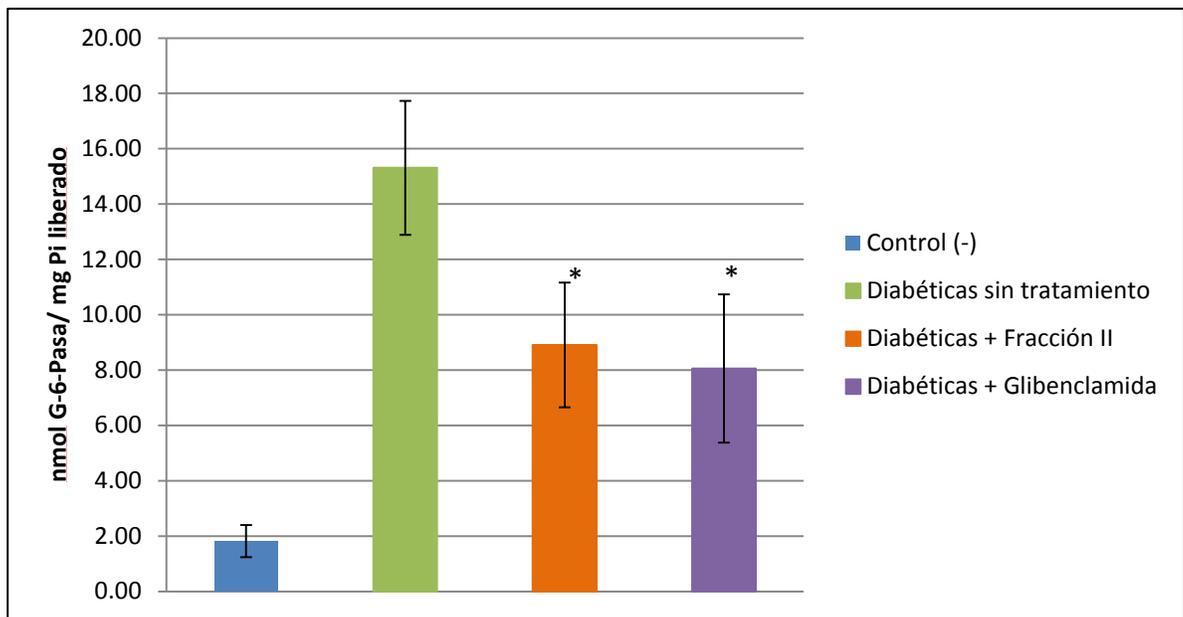


Figura 15. Niveles de glucosa-6-fosfatasa hepática en los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio ± D.E. expresado en nmol/mg de Pi liberado. n=8 *p<0.05

3.6 Inhibición de la alfa-glucosidasa.

La Tabla 17 y Figura 16 muestran los resultados de la prueba de inhibición de la alfa-gucosidasa *in vitro*.

Los resultados muestran que la Fracción II, la cual fue evaluada en tres concentraciones (1, 10 y 100 µg/mL) no produjo inhibición de la alfa-glucosidasa, por lo que su concentración inhibitoria 50 (IC50) no fue determinada.

Tabla 17. Porcentaje de inhibición de alfa-glucosidasa.

	Concentración		
	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
Quercetina	6.7*	83*	-
Fracción II	0	0	0

Los valores representan el promedio de tres a cuatro experimentos independientes \pm D.E. $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**)

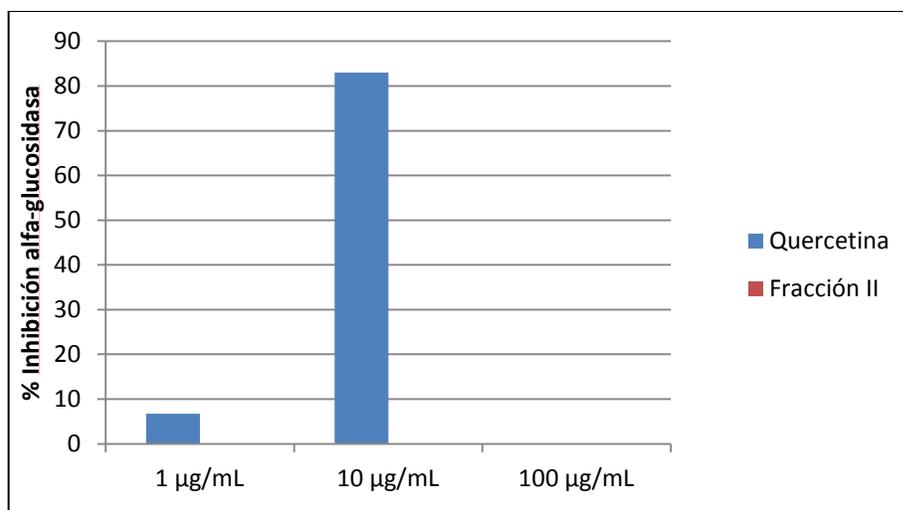


Figura 16. Inhibición de la alfa-glucosidasa. Los datos representan el promedio \pm D.E. * $p < 0.05$

3.7 Determinación de proteínas por el método de Lowry.

La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos en la determinación de proteínas tanto en el homogenado de hígado como el de los riñón de las ratas de los diferentes grupos de estudio.

Tabla 18. Concentración de proteínas en el día 21 de tratamiento.

Grupo	Hígado mg/mL	Riñón mg/mL
Control (-)	49.29 \pm 3.40	37.40 \pm 7.71
Diabéticas sin tratamiento	44.20 \pm 3.99	51.74 \pm 18.4
Diabéticas + Fracción II	51.1 \pm 1.75	35.11 \pm 5.37
Diabéticas + Glibenclamida	38.80 \pm 1.67	32.78 \pm 6.05

Los datos representan la media \pm D.E. n=8 * $p < 0.05$

La Figura 17 muestra las concentraciones de proteína hepática y renal en los diferentes grupos de estudio.

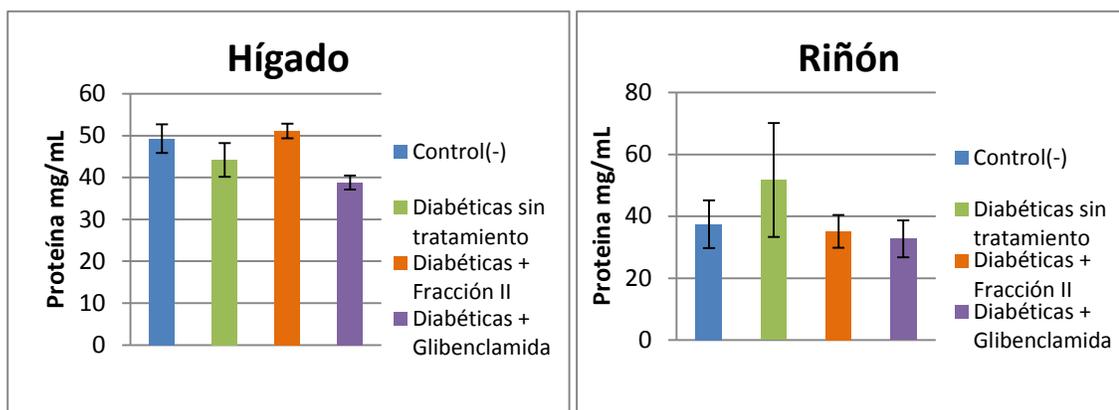


Figura 17. Niveles de proteína en hígado y riñón de rata en los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio \pm D.E. expresado en mg/mL. n =8 *p<0.05

3.8 Determinación de los niveles de glutatión.

Los niveles de glutatión fueron evaluados tanto en el homogenado de hígado como en el de riñón, con el objetivo de determinar el posible efecto antioxidante de la Fracción II.

Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de glutatión hepático en las ratas que recibieron la Fracción II fueron semejantes a los de las ratas sanas. Las ratas diabéticas sin tratamiento mostraron niveles de glutatión menores a los observados en los otros grupos experimentales. Aunque las

ratas tratadas con Glibenclamida también mostraron niveles estadísticamente significativos más altos de glutatión, el mayor efecto se observó en las ratas tratadas con la Fracción II.

Con respecto a los niveles de glutatión en el riñón, no se observaron diferencias significativas entre las ratas diabéticas sin tratamiento y las tratadas tanto con la Fracción II o con Glibenclamida.

La Tabla 19 los niveles de glutatión obtenidos en los diferentes grupos experimentales.

Tabla 19. Niveles de glutatión (GSH) en el día 21 de tratamiento.

Grupo	Hígado µg/mg proteína	Riñón µg/mg proteína
Control (-)	1.705 ± 0.28*	1.32±0.24
Diabéticas sin tratamiento	0.993 ± 0.11	0.42±0.15
Diabéticas + Fracción II	1.62 ± 0.32*	0.65±0.21
Diabéticas + Glibenclamida	1.26 ± 0.19	0.74±0.33

Los datos representan la media ± D.E. n=8 *p<0.05

La Figura 18 muestra la representación gráfica de los resultados.

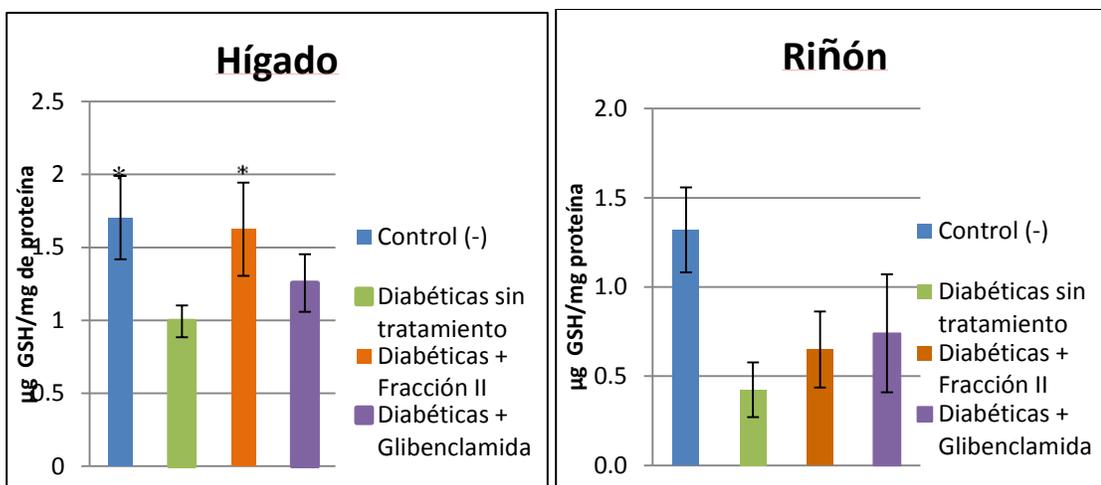


Figura 18. Niveles de glutatión en hígado y riñón de rata en los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio \pm D.E. expresado en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína * $p < 0.05$. $n=8$.

3.9 Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.

En forma semejante a los resultados obtenidos al determinar los niveles de glutatión, la peroxidación de lípidos también fue significativamente mayor en las ratas diabéticas sin tratamiento que en las ratas diabéticas tratadas con la Fracción II o Glibenclamida y que las ratas sanas.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de malondialdehído de las ratas tratadas con la Fracción II y la Glibenclamida

Al igual que lo observado con los niveles de glutatión, en el caso del riñón no se observaron diferencias significativas entre las ratas diabéticas sin tratamiento y las tratadas con la Fracción II o con la Glibenclamida.

La Tabla 20 muestra los resultados obtenidos en la determinación de niveles de peroxidación lipídica (MDA) en el hígado y el riñón de los diferentes grupos experimentales.

Tabla 20. Niveles de peroxidación lipídica (MDA) de los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.

Grupo	Hígado nmol/mg proteína	Riñón nmol/mg proteína
Control (-)	7.41 ± 1.69	5.96 ± 1.911
Diabéticas sin tratamiento	20.48 ± 8.04	18.54 ± 5.940
Diabéticas + Fracción II	10.11 ± 2.53*	14.48 ± 5.10
Diabéticas + Glibenclamida	10.58 ± 1.73*	15.09 ± 6.05

Los datos representan la media ± D.E. n=8 *p<0.05

La Figura 19 muestra los resultados obtenidos en la determinación de peroxidación lipídica de los diferentes grupos de estudio en el día 21 de tratamiento.

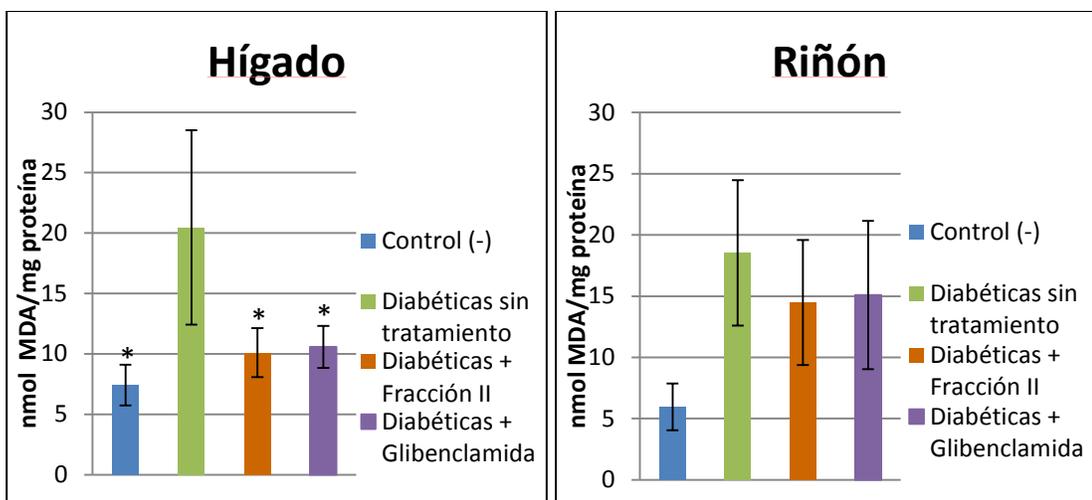


Figura 19. Niveles de peroxidación lipídica (MDA) en hígado y riñón de rata en los diferentes grupos de estudio. Los datos representan el promedio \pm D.E. expresado en nmol/mg de proteína. $n = 8$ * $p < 0.05$

3.10 Análisis morfológico.

No se observaron alteraciones histológicas en este modelo de estudio en órganos como hígado y páncreas. Los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21, respectivamente.

Sin embargo, en el riñón sí presentó cambios morfológicos que consistieron en alteraciones a nivel tubular con abundante presencia de células claras. Estos cambios morfológicos se observaron tanto en las ratas diabéticas sin tratamiento como en las tratadas con la Fracción II o la Glibenclamida, aunque son más evidentes en las ratas diabéticas sin tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 22.

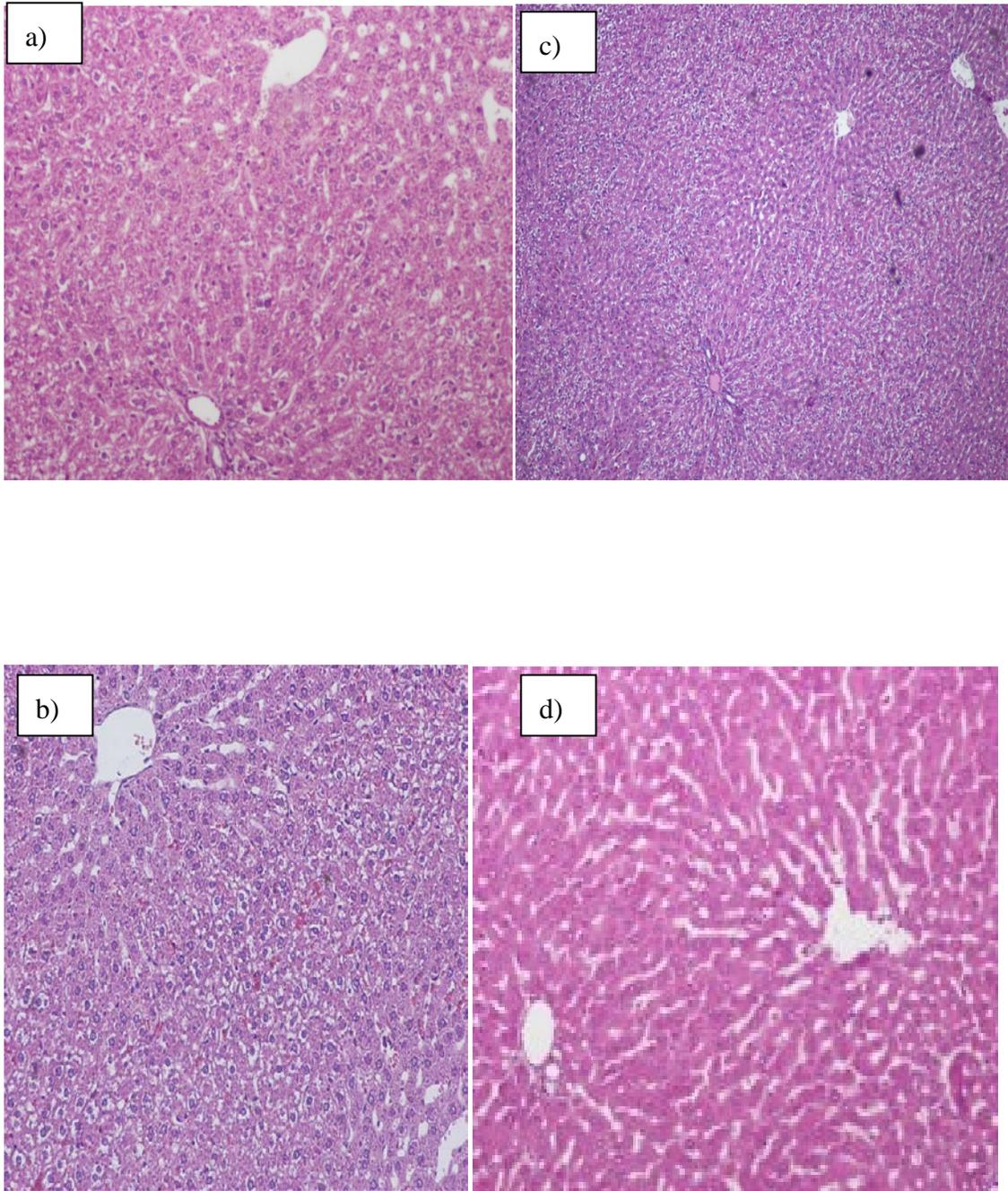


Figura 20. Morfología del hígado en los diferentes grupos de estudio, tinción HyE, 40X: a) Control (-), b) Diabéticas sin tratamiento, c) Fracción II y d) Glibenclamida.

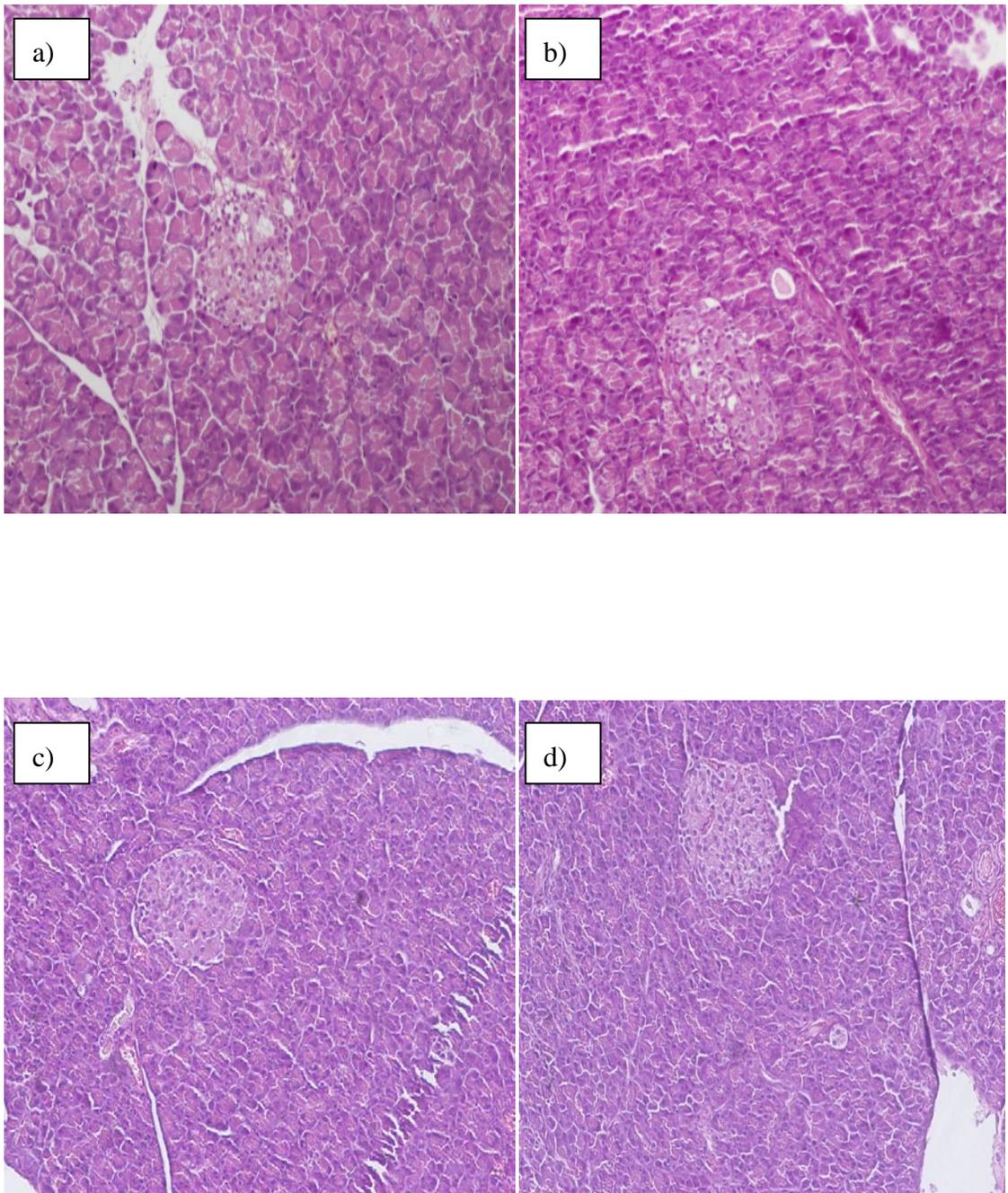


Figura 21. Morfología del páncreas en los diferentes grupos de estudio, tinción HyE, 40X: a) Control (-), b) Diabéticas sin tratamiento, c) Fracción II y d) Glibenclamida.

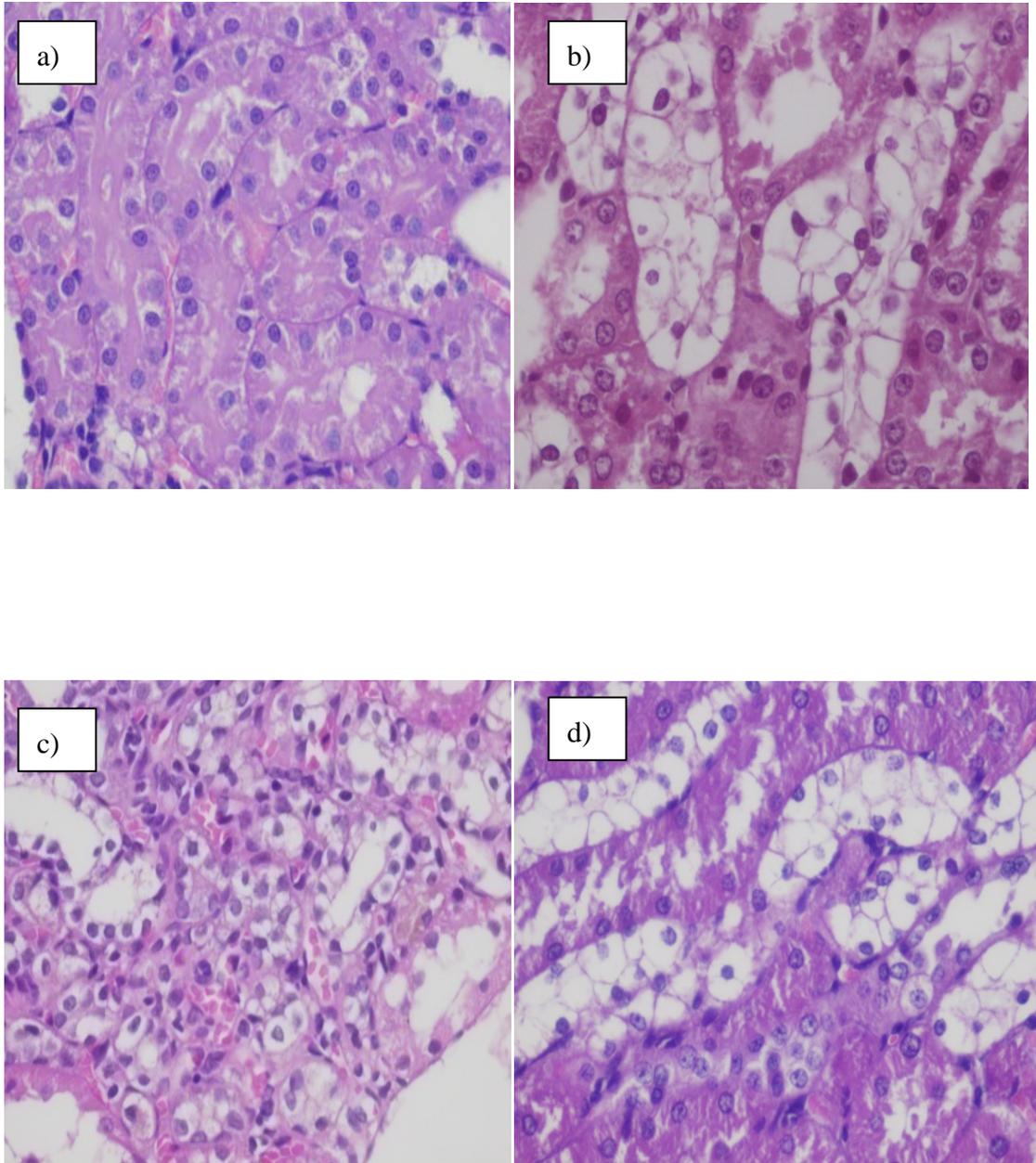


Figura 22. Morfología de riñón en los diferentes grupos de estudio, tinción HyE, 40X: a) Control (-), b) Diabéticas sin tratamiento, c) Fracción II y d) Glibenclamida.

3.11 Caracterización química.

La prueba de fenol-ácido sulfúrico nos indicó la presencia de carbohidratos en nuestra Fracción II. (Figura 23)



Figura 23. Positividad para la prueba fenol-ácido sulfúrico de la Fracción II.

Para la caracterización de la Fracción II la hidrólisis ácida fue basada en la reacción presentada en la Figura 24, una vez llevada a cabo se procedió a realizar la separación en columna obteniendo 10 fracciones de 10 mL de cada sistema de elución utilizado. (metanol:agua 95:5,90:10,85:15 y 75:25)

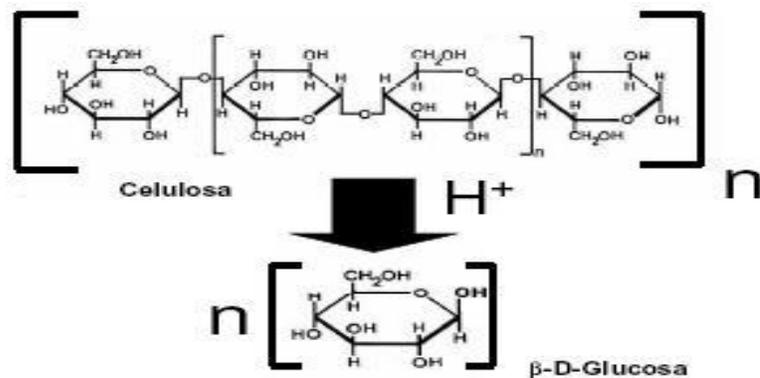


Figura 24. Hidrólisis de un polisacárido.

Una vez evaporado el solvente se corrió una cromatografía en capa delgada de cada residuo obtenido, con un sistema de elución metanol:agua 80:20, el cual posteriormente fue revelado con sulfato cérico.(Figura 25)

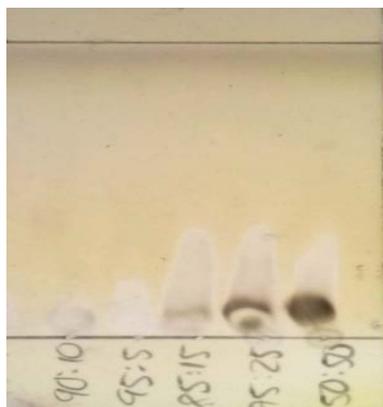


Figura 25. Sistema cromatográfico obtenido de los residuos por separación en columna.

El residuo obtenido con la elución metanol:agua 75:25 formo cristales, loa cuales fueron sometidos a un análisis de RMN-¹H arrojando el siguiente espectro (Figura 26):

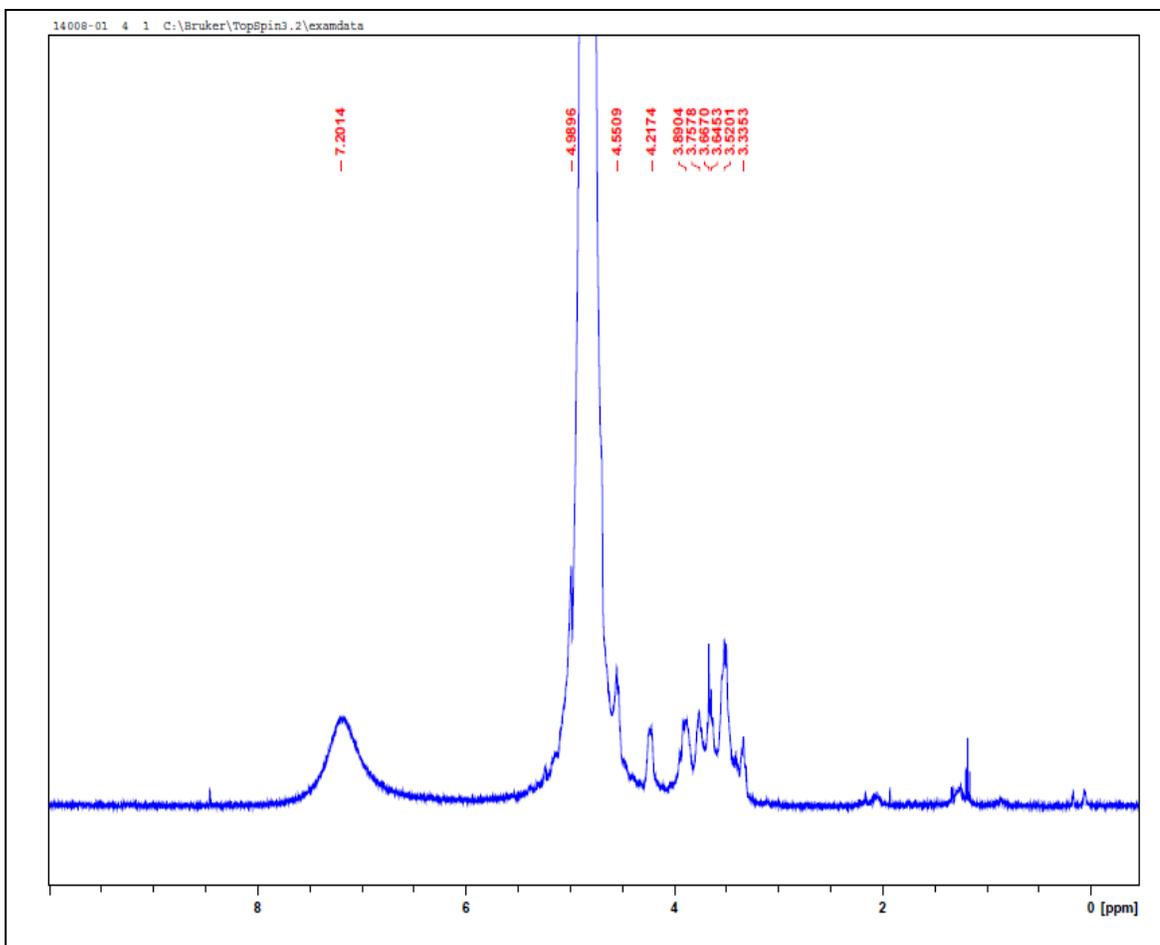


Figura 26. Espectro de RMN-¹H del residuo 75:25 obtenido de la hidrólisis de la Fracción II.

Los resultados obtenidos nos confirman la presencia de polisacáridos en nuestra Fracción II debido al desplazamiento químico presentado entre δ_H 3.3 a 5.8 ppm.

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

La diabetes tipo II es un problema de salud que impacta a la sociedad a nivel global, cuyo número aumenta continuamente, por lo que es importante encontrar nuevas terapias y alternativas para su tratamiento.

Algunos compuestos aislados de plantas y hongos han demostrado poseer actividad antidiabética. Existen reportes en la literatura de la actividad antidiabética de los polisacáridos presentes en los macromicetos. ^(33, 34,35,37,38,39,40,46)

La Fracción II es un compuesto obtenido del extracto acuoso de *Neolentinus lepideus*. La actividad antidiabética de la Fracción II fue reportada anteriormente por Tamez de la O y colaboradores. ⁽⁵⁹⁾

Sin embargo, el mecanismo de acción mediante el cual la Fracción II produce su efecto antidiabético no había sido esclarecido ni se cuenta con información relacionada con la caracterización de él o los posibles compuestos activos y de su posible efecto protector sobre el daño oxidativo producido por la hiperglicemia ⁽⁹⁾.

Para poder determinar el posible mecanismo de acción se realizaron las siguientes pruebas: concentración de insulina en sangre, concentración de glucógeno hepático, la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa hepática y la inhibición de la α -glucosidasa.

Para evaluar la posible protección contra el estrés oxidativo producido por la hiperglicemia se realizaron las siguientes pruebas: concentración de glutatión hepático y renal, lipidoperoxidación hepática y renal y una evaluación morfológica de hígado, riñón y páncreas.

Las pruebas para determinar el posible mecanismo de acción y la posible protección contra el estrés oxidativo se realizaron *in vivo* y se usó a la Glibenclamida, un hipoglucemiante oral que pertenece a las sulfonilureas de segunda generación como control positivo. ^(16,17)

Por último para caracterizar él o los principios activos presentes en la Fracción II se realizaron las siguientes pruebas: fenol-ácido sulfúrico y RMN-¹H.

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas wistar macho, a las que se les indujo diabetes con aloxana. El parámetro establecido para determinar que las ratas eran diabética fue niveles de glucosa mayores a 200 mg/dL. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron en los tiempos 0 (basal) y 4 h después de la administración del tratamiento (agua destilada, Fracción II o Glibenclamida), en los los días 1, 7, 14 y 21.

Los niveles de glucosa en sangre en las ratas sanas que solo recibieron agua destilada durante 21 días fueron menores a 100 mg/dL y mostraron una reducción de éstos menor al 6.5%. Las ratas diabéticas sin tratamiento, que recibieron agua destilada, presentaron niveles promedio de glucosa superiores a 400 mg/dL y al igual que las ratas sanas, la reducción de la glucosa fue menor al 6.5%. Con respecto a las ratas tratadas con la Fracción II o Glibenclamida, los niveles de glucosa en sangre fueron menores a 354 y 386 mg/dL a las 4 horas posteriores al tratamiento y mostraron reducciones de glicemia de 31.3 y 31.7%, respectivamente. Estos resultados demuestran que la Fracción II tiene un efecto hipoglucemiante muy semejante al de la Glibenclamida. Adicionalmente, los resultados en la glicemia fueron mejorando conforme transcurrían los días en que fue administrado el tratamiento, mostrando el mayor efecto hipoglucemiante el día 21 de tratamiento.

De acuerdo a las mediciones de peso de las ratas, realizadas los días 1, 7, 14 y 21 de tratamiento, las ratas sanas incrementaron su peso en un 17.9% (195.5 a 230.6 g) a lo largo del estudio, mientras que las ratas diabéticas mostraron el efecto contrario y perdieron un 15% peso en relación al peso inicial (196.30 a 166.6 g). Las ratas tratadas con la Fracción II también aumentaron de peso, pero en menor proporción que las ratas sanas (202.75 a 212.5 g). Las ratas que fueron tratadas con Glibenclamida perdieron 9.8% peso (190.88 a 172 g).

En el día 21 de tratamiento fueron tomadas las muestras de sangre para medir la cantidad de insulina en sangre de los diferentes grupos

experimentales, con el objetivo de determinar si la Fracción II actuaba como un secretagogo de insulina. Las concentraciones de insulina promedio de las ratas diabéticas disminuyeron hasta en un 70% en comparación con las concentraciones de las ratas sanas. En el grupo de ratas tratadas con la Fracción II, las concentraciones promedio de insulina no mostraron diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones mostradas por con las del grupo de ratas tratadas con Glibenclamida, que es un hipoglucemiante oral que pertenece al grupo de las sulfonilureas cuyo mecanismo de acción es estimular la secreción de insulina y aumentar la sensibilidad de los tejidos a la misma, ⁽⁷²⁾ por lo que se podría considerar que el mecanismo por el cual la Fracción II ejerce su efecto antidiabético es a través la liberación de insulina.

Los niveles de insulina aumentaron significativamente en los grupos tratados con la Fracción II y Glibenclamida en comparación con el grupo de ratas diabéticas que no recibieron tratamiento. Estos resultados son similares a los reportados por Yang y colaboradores, ⁽⁵²⁾ quienes reportaron un aumento del 22% en los niveles de insulina plasmática en los animales tratados con el Exopolímero obtenido de *Lentinula edodes*, lo cual se relacionó con un aumento en la secreción de insulina. Estos resultados también sugieren que el Exopolímero estimula la reparación del daño en las células β pancreáticas. En estudios realizados por Gray y colaboradores con el extracto acuoso de *Agaricus campestris* se observó un aumento significativo en los niveles de insulina tanto en líneas celulares pancreáticas como en animales tratados con

este hongo. ^(74,75) estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio con la Fracción II.

La insulina tiene numerosos efectos sobre el metabolismo energético, en tejidos como hígado, su efecto global es la utilización coordinada de la glucosa, almacenamiento de glucógeno, ácidos grasos y la síntesis de proteínas.

Con respecto a los niveles de glucógeno hepático, los cuales fueron evaluados con el objetivo de determinar si la Fracción II aumentaba la captación de glucosa en tejidos, los resultados mostraron niveles significativamente mayores de glucógeno tanto en las ratas tratadas con la Fracción II como con la Glibenclamida, en comparación con las ratas sanas y las diabéticas que no recibieron tratamiento. Se ha reportado que la diabetes inducida por aloxana en ratas diabéticas perjudica la capacidad normal del hígado para sintetizar glucógeno. ^(77,78,79) Adicionalmente, Raju y colaboradores reportaron que el aumento de la producción de glucosa hepática en la diabetes se puede derivar de la glucogenólisis y/o gluconeogénesis,⁽⁸⁰⁾ lo cual se relaciona con los niveles de glucógeno hepático, por lo que en la diabetes los niveles de glucógeno están disminuidos. De esta manera, con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que la Fracción II, al igual que la Glibenclamida, estimula la captación de glucosa por el hígado, que a su vez es almacenada en forma de glucógeno.

En cuanto a la glucosa-6-fosfatasa durante el ayuno corto, la degradación del glucógeno hepático (glucogenólisis) aporta glucosa a la sangre. Cuando el ayuno se prolonga, se estimula la síntesis de nuevo de

glucosa (gluconeogénesis), en particular en hígado y riñón, para proporcionar glucosa a la sangre. La enzima glucosa-6-fosfatasa cataliza la reacción final de la gluconeogénesis jugando un papel muy importante en el mantenimiento de la glicemia.⁽⁸¹⁾ Los resultados obtenidos al evaluar la actividad de la glucosa-6-fosfatasa hepática muestran que las ratas que fueron tratadas con la Fracción II y con Glibenclamida, tuvieron una actividad significativamente menor en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento, lo que indica que hay una menor conversión de glucógeno a glucosa, lo cual concuerda con lo encontrado en la medición de glucógeno hepático. Esto sugiere una reducción de la capacidad de aportar glucosa a la sangre por la acción de la glucosa 6 fosfatasa. Existen reportes en la literatura, que corroboran estos resultados, como los de Lavoiey Van deWerve,⁽⁸²⁾ Ahmed⁽⁸³⁾ y Abdel-Moneim y colaboradores⁽⁸⁴⁾ en donde en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina se demostró que el contenido de glucógeno hepático disminuyó con un aumento la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en las ratas diabéticas.

Por último, la Fracción II no inhibió a la enzima α -glucosidasa, que es el mecanismo de acción de la acarbosa y el miglitol, considerados como medicamentos antihiperlipemiantes orales, que inhiben la absorción de carbohidratos a nivel gastrointestinal.

Por otro lado, existen numerosos reportes que indican que la diabetes mellitus incrementa la producción de radicales libres derivados del oxígeno, anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH) en

cantidades superiores a los niveles fisiológicos, los que sobrepasan la capacidad antioxidante endógena, llevando a un aumento en el estrés oxidativo.^(9,85) La generación de estrés oxidativo y el pobre estatus antioxidante llevan al incremento de la peroxidación lipídica en los tejidos de los animales diabéticos. Las elevadas concentraciones de peróxidos lipídicos pueden propagar el daño oxidativo, contribuyendo al deterioro funcional de diferentes órganos como pueden ser hígado, riñón y el páncreas.⁽⁸⁶⁾

Los niveles de glutatión en hígado en las ratas tratadas con la Fracción II y en las tratadas con Glibenclamida muestran que existe una protección contra el estrés oxidativo causado por la hiperglicemia en este órgano en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento. El glutatión es el antioxidante endógeno más abundante involucrado en numerosas funciones vitales para las células.^(88,89) Cuando los niveles de glutatión se mantienen, el daño celular generado por las especies reactivas de oxígeno, tiende a ser menor, el hígado constituye el órgano central para el metabolismo de este compuesto y puede proveer a otros tejidos vía circulación interórganos. En un estudio realizado con 200 pacientes diabéticos tipo I y tipo II, con y sin fallo renal diagnosticado y 50 personas sanas, se midieron sus niveles de glutatión. Se encontró que los niveles de glutatión, estaban significativamente más bajos en los pacientes diabéticos en comparación, que en las personas sanas.⁽⁹⁰⁾

De la misma manera, los niveles aumentados de malondialdehído en las ratas tratadas con la Fracción II y las tratadas con Glibenclamida muestran que existe una menor peroxidación de lípidos demostrando que ambos tratamientos

tienen un efecto antioxidante y protegen, al igual que lo observado con el glutatión, del estrés oxidativo, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura respecto al uso de antioxidantes en diabetes mellitus. (91,92,93,94,95)

Los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de glutatión y malondialdehído muestran un evidente estrés oxidativo en las ratas diabéticas en los órganos evaluados (hígado y riñón). Sin embargo, a pesar de que los niveles tanto de glutatión como de malondialdehído en las ratas tratadas tanto con la Fracción II como con Glibenclamida muestran niveles estadísticamente mayores en el caso del hígado, estos resultados difieren de los obtenidos en el riñón donde no hubo diferencias significativas entre las ratas diabéticas sin tratamiento y las ratas tratadas tanto con la Fracción II como con Glibenclamida. El riñón resultó ser el órgano más afectado en términos de niveles reducidos de glutatión y del aumento en la peroxidación lipídica, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura.⁽⁸⁷⁾

Con respecto a la evaluación morfológica se observaron diferencias en hígado y páncreas entre los diferentes grupos de estudio. Se observaron alteraciones inespecíficas en riñón con un incremento en el número de células claras y cambios reactivos tanto en las ratas diabéticas sin tratamiento como en las que fueron tratadas con la Fracción II o con la Glibenclamida.

Las alteraciones a nivel renal concuerdan también con los resultados obtenidos en la peroxidación de lípidos y los niveles de glutatión.

Por último, en relación a la caracterización química del sólido obtenido de la Fracción II de *Neolentinus lepideus*, el espectro de resonancia magnética

nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) mostró señales múltiples en la región de δ_H 3.3 a 5.8 ppm correspondientes a protones geminales a grupos hidroxilo y por ende atribuibles a la presencia de polisacáridos. Los polisacáridos son polímeros constituidos por más de 10 unidades de monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos α o β después de la condensación del grupo hidroxilo hemiacetalico de un monosacárido con el grupo hidroxilo primario o secundario de otro monosacárido. ⁽⁹⁷⁾ La caracterización química de los polisacáridos puede facilitarse mediante la degradación, por hidrólisis ácida o básica de los enlaces glicosídicos, en sacáridos más pequeños como los monosacáridos, disacáridos u oligosacáridos. En un estudio realizado por Kim y col. ⁽⁹⁸⁾ se purificaron y caracterizaron proteo-heteroglicanos-ácidos del cuerpo fructífero de *Phellinus linteus*. Kim y col. reportaron que el espectro de RMN-¹H mostró señales en un desplazamiento químico de δ_H 3.43 ppm hasta 5.05 ppm, las cuales corresponden a proteoheteroglicanos ácidos formados por la combinación de uniones glicosídicas α o β . Por otra parte, Waiter y col. reportaron que los cuerpos fructíferos de los macromicetos *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Piptoporus betulinus* y *Laetiporus sulphureus* (Figura 27a) están constituidos de $\alpha(1-3)$ -D-glucanos, los cuales fueron caracterizados mediante RMN-¹H por la presencia de señales múltiples en la región de δ_H 3.43 ppm hasta 5.05 ppm. ⁽⁹⁹⁾ Cabe señalar que, el patrón de señales de los espectros de RMN-¹H de los proteoheteroglicanos y $\alpha(1-3)$ -D-glucanos muestran una gran similitud al patrón de señales (δ_H 3.43 ppm hasta 5.05 ppm) observado en el espectro de RMN-¹H (Figura 27b) del sólido obtenido a partir

de la Fracción II del hongo *Neolentinus lepideus*. Particularmente, el espectro de RMN-¹H de la Fracción II de *Neolentinus lepideus* presenta mayor similitud a la multiplicidad y patrón de señales observadas en el espectro de RMN-¹H de *Laetiporus sulphureus*, por lo que puede sugerirse que la Fracción II se compone de α -D-glucanos. No obstante esta caracterización química preliminar, se continuara con la realización de diversos protocolos químicos y espectroscópicos para la caracterización estructural definitiva de dicha fracción, entre los que se pueden destacar las hidrólisis totales en medio ácido (H₂SO₄, HCl), seguidas de O-metilación en C1 (CH₃OH/HCl) o poli-O-metilación (CH₃I/Ag₂O) o poliacetilación [(CH₃CO)₂O/piridina] y posterior análisis por RMN-¹H.

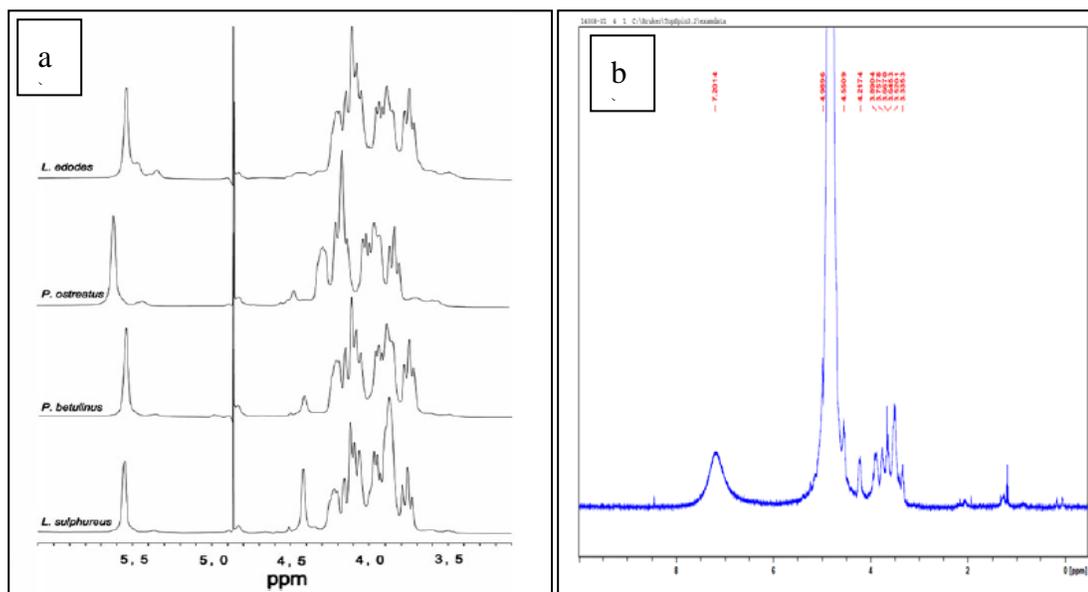


Figura 27. Comparación de los espectros de RMN-¹H (D₂O, 300 o 400 MHz) de: a) polisacáridos obtenidos de *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Piptoporus betulinus* y *Laetiporus sulphureus*, b) polisacáridos obtenidos de la Fracción II de *Neolentinus lepideus*.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

1. La Fracción II de *Neolentinus lepideus* ejerce su efecto hipoglucemiante a través de la liberación de insulina.
2. Se observó un incremento en los niveles de glucógeno hepático y disminución de la glucosa 6-fosfatasa en ratas diabéticas tratadas con Fracción II, lo que indica que además de actuar como un secretagogo de insulina también actúa estimulando la captación de glucosa en el hígado.
3. La Fracción II de *Neolentinus lepideus* no produjo inhibición de la α -glucosidasa, por lo tanto no inhibe la absorción de carbohidratos a nivel intestinal.

4. La Fracción II de *Neolentinus lepideus* incrementó los niveles de glutatión hepático y disminuyó la peroxidación de lípidos mostrando un efecto antioxidante protector contra los daños producidos por el estrés oxidativo.

5. El espectro de RMN-¹H de la Fracción II de *Neolentinus lepideus* sugiere que el o los compuestos activos contienen polisacáridos de tipo α-D-glucanos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. 2010. Módulo Diabetes. *Salud del Niño y del Adolescente*. [Online] 2010. [Cited: 02 13, 2014.] <http://www.opsecu.org/jspui/bitstream/123456789/136/3/136.pdf>.
2. Federación Mexicana de Diabetes, A.C. 2013. [Online] 2013. http://www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php.
3. International Diabetes Federation. 2012. <http://www.idf.org/about-diabetes?language=es>. [Online] 2012.
4. Mcphee, Stephen J, et al. 2000. *Fisiopatología médica una introducción*. 2da. s.l.: Ed. El Manual Moderno, pp. 491-522.
5. King, H., Aubert, R.E. and Herman, W.H. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, Vol. 21, pp. 1414-31.
6. American Diabetes Association. 2011. [Online] Octubre 13, 2011. <http://www.diabetes.org/>. [Online]
7. Ibarra, Emma y Cantu, Pedro. 2003. Años de vida productiva perdidos por complicaciones crónicas de Diabetes Mellitus en población económicamente activa. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Vol. 4.
8. Harrison. 2006. *Harrison Principios de Medicina Interna*. Capítulo 338. Diabetes mellitus. 16. Ed. McGraw-Hill

9. Ibarra, M.L., Batista C.M., Gomez, B.C. y Zamora, A.L. 2006. DIABETES, ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES. Abril, *Investigación en Salud*, Vol. III.
10. *INEGI*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Octubre Octubre, pp. 1-12.
11. Villarreal-Ríos, E., Salinas-Martínez, A., Medina Jauregui, A., Garza Elizondo, M., Nuñez-Rocha, G., and Chuy-Díaz, E. 2000. The cost of Diabetes Mellitus and its impact on health spending in Mexico. *Archives of Medical Research.*, Vol. 31, pp. 511-514.
12. West, S., Klein, R., Rodriguez, J., Munoz, B., Broman, A., Sanchez, R., and Snyder, R. 2001. Diabetes and Diabetic Retinopathy in a Mexican-American Population. Epidemiology Health Services Psychosocial Research. *Diabetes Care*, Vol. 31, pp. 1204-1209.
13. ENSANUT 2012. [Online]
<http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>.
14. Ramos, H. and Méndez, J. 1994. Diabetes mellitus experimental. *Ciencia Veterinaria*, pp. 344-377.
15. Mordes, J.P. and Rossini, A.A. 1981. Animal models of diabetes. *Am J. Med.*, Vol. 70, pp. 353-360.
16. Dipiro, Talbert, Yee, Matzke, Wells, Posey. Pharmacotherapy. A pathophysiologic approach. 7th Edition. Estados Unidos de América: McGraw-Hill Medical. ISBN 0-07-164325-7. DOI: 10.1036/007147899X., 2008.
17. Goodman, A. 1996. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9a. pp. 1603-1607.

18. Scheen, A.J. 1997. Drug treatment of Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus in the 1990s. *Drugs*, pp. 355-368.
19. Scheen, A.J. and Lefebvre, P.J. 1998. Oral antidiabetic agents. *Drugs*, pp. 225-236.
20. Inzucchi, S.E. 2002. Oral antihyperglycemia therapy for type 2 diabetes. *JAMA*, pp. 360-372.
21. Lawrence-Roberts, V. 1999. Tratamiento farmacológico actual de la diabetes tipo 2: sulfonilureas, meglitinidas, biguanidas, inhibidores de la α -glucosidasa y tiazolidinedionas. *Diabetes Care* (Suppl. en Español), pp. 16-19.
22. Alarcon-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R. and Pérez-Gutierrez, S. 2002. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.*, pp. 101-110.
23. Bnouham, M., Merhfour, F.Z., Ziyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M. and Legssyer, A. 2003. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, pp. 677-681.
24. Kavalali, G., Goksel, S. and Hatemi, H.H. 2003. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, pp. 241-245.
25. Diaz, J.L. 1976. Uso de plantas medicinales de Mexico. Instituto Mexicano para el estudio de plantas medicinales A.C. *Monografías científicas II*, pp. 145-146.
26. Somani, R., Kasture, S. and Kumar, A. 2006. Antidiabetic Potential of *Butea monosperma* in rats. *Fitoterapia*, Vol. 77, pp. 86-90.
27. Lui, J. 2004. N-containing Compounds of Macromycetes. *Chem Rev.*, pp. 2723-2744.

28. Zhang, H.N., Lin, Z. 2004. Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Acta pharmacologica Sinica*, Vol. 25, pp. 191-195.
29. Wasser, S.P. and Weis, A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, pp. 31-62.
30. Breene, W. 1990. Nutritional and Medicinal Value of Specially Mushrooms. *J. Food Prod*, pp. 883-84.
31. Hobbs, C. 2004. Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. Santa Cruz, *Botanical Press*.
32. Dickinson, C., & Lucas, J. 1982. The Encyclopedia of the mushrooms. *Crescent Books*. New York.
33. Hideyuki, M., Asakawa, C. and Kurimoto, M. 2002. α -Glucosidase inhibitor from the seeds of Balsam Pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola Frondosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, pp. 1576-1578.
34. Chalenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro. CONABIO, Instituto de Biología, UNAM., *Agrupación Sierra Madre, S.C.*
35. Guzman, G. 1998. Inventorying The fungi of Mexico. *Biod. and Conser.*, Vol. 7, pp. 369-384.
36. Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., and Hayashi, T. 1985. Isolation and hypoglycaemic activities of ganoderans A and B, glucans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med*, Vol. 51, pp. 339-40.

37. Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J. and Zhou, S. 2004. A phase I/II study of ling zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt. Fr.) Lloyd (*Aphyllophoromycetidae*) extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int J Med Mushrooms*, Vol. 6, pp. 33-9.
38. Ikuzawa, M., Oguchi, Y., Matsunaga, K., Toyoda, N., Furusho, T. and Fujii, T. 1985. Pharmaceutical preparation containing a glycoprotein. *German Patent DE 3, 429, 551*.
39. Konno, S., Aynehchi, S., Dolin, D.J., Schwartz, A.M., Choudhury, M.S. and Tazakin, H.N. 2002. Anticancer and hypoglycemic effects of polysaccharides in edible and medicinal Maitake mushroom [*Grifola frondosa* (Dicks. Fr.) S.F. Gray]. *Int. J. Med. Mushrooms*, Vol. 4, pp. 185-95.
40. Hishida, I., Nanba, H. and Kuroda, H. 1988. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (maitake). *Tokyo, Chem Pharm Bull*, pp. 1819-27.
41. Furuse, M., M., Kimura, C., Mabayo, R.T., Takahashi, H., Okumura, J. 1993. Dietary sorbose prevents and improves hyperglycemia in genetically diabetic mice. *J. Nutr.*, pp. 59-65.
42. Kamal, P. and Li, Y. 2011. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. *Functional Foods in Health and Disease*, pp. 161-171.
43. Kenneth, J. 1995. Shiitake: The Healing Mushroom. *Healing Arts Press*. Vermont, pp. 13-18.
44. Kiho, T., Sobue, S., Ukai, S. 1994. Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*. *Carbohydr. Res.*, pp. 81-87.

45. Kiho, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S., and Ukai, S. 1996. Polysaccharide in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 19, pp. 294-296.
46. Kiho, T., Morimoto, H., Sakushima, M., Usui, S., Ukai, S. 1995. Polysaccharide in fungi, XXXV. Antidiabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremela aurantia*. *Biol. Pharm. Bull.*, pp. 1627-1629.
47. Kiho, T., Itahashi, S., Sakushima, M., Matsunaga, T., Sakamoto, H., and Ishiguro, Y. 1997. Polysaccharide in fungi. XXXVIII. Antidiabetic activity and structural features of galactomannan elaborated by *Pestalotiopsis* species. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 20, pp. 118-121.
48. Wasser, S.P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 89, pp. 1323-1332.
49. Ikekawa, T., Uchara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M. and Fukuoka F. 1999. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Res.*, pp. 735-735.
50. Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. 1969. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Nature*, Vol. 222, pp. 687-688.
51. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. et al. 1987. Antitumor metastasis-inhibitory activities of Lentinan as an immunomodulator: An Overview. *Cancer Detect Prev.*, Vol. 1, pp. 423-443.

52. Yang, B., Kim, D., Jeong, S., Das, S., Choi, Y., Shin, J., Lee, S., and Song, C. et al. 2002. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* Exo-polymer Produced from a Submerged Mycelial Culture. *Bios. Biotechnol. Biochem.*, pp. 937-942.
53. Kim, M., Park, M.H., and Kim, G.H. 1997. Effects of mushroom protein-bound polysaccharids on the blood glucose levels and energy metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor. Nutr.*, Vol. 30, pp. 743-750.
54. Hobbs, C. 1995. Medicinal Mushroom: An Exploration of Tradition, Healing and Culture. *Botanica Press*.
55. Chang, R. 1996. Functional Properties of edible mushroom. *Nutr. Rev.*, Vol. 54, pp. 91-93.
56. Sugiyama, K. and Yamakawa, A. 1996. Dietary Eritadenina-induced alteration of molecular species composition of phospholipids in rats. *Lipids*, Vol. 31, pp. 399-404.
57. Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., and Takada, K. 1999. Three Kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk) sing (Shiitake, an edible mushroom). *Int. Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 151-157.
58. Garza-Ocañas, L., Ramírez Gómez, X.S., Garza-Ocañas, F., Salinas Carmona, M.C., Waksman de Torres, N., Alcaraz Contreras, Y., Torres Alanis, O. 2006. Evaluación de la Actividad Biológica de Extractos Acuáticos de Macromicetos del Noreste de México. *Ciencia UANL*, Vol. 9 (2), pp. 164-170.
59. Tamez de la O, E., Garza-Ocañas, L., María Teresa Zanatta-Calderón, M.T., Lujan-Rangél, R., Garza-Ocañas, F., Badillo-Castañeda, C.T., and Ramírez Gómez, X.S. 2013. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of aqueous and methanolic extracts of *Lentinus lepideus*, *Calvatia Cyathiformis* and *Ganoderma applanatum*, from

Northeastern of Mexico, in Wistar rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, pp. 661-668.

60. Statements, P. 1983. The mushrooms cultivator. A practical guide to growing Mushrooms at home. pp. 15-37

61. Turner, W.B. 1971. Fungi, their cultivation and their secondary metabolism. In Fungal Metabolites. England, Academic Press, pp. 11-23

62. Mizuno, T. 1986. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa*. *Agric. Bio. Chem. I*, Vol. 50, pp. 1679-1688.

63. Millipore Corporation. Rat Serum Adipokine 96 well plate assay, cat # RADPK-81K.

64. Seifter, S., Dayton, S., Novice, B., Muntwyler, E. 1950. Estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch. Biochem.*, Vol. 25, pp. 191-200.

65. Harper, A.E. 1963. Glucose-6-phosphatase In Methods of enzymatic analysis. New York: s.n., 1963, *Bergmeyer HU, Academic Press*.

66. Li, W.; Fu, H.; Bai, H.; Sasaki, K.; 2009. Triterpenoid Saponins from *Rubus ellipticus* var. *obcordatus*. *Journal of Natural Products*. 72: 1755-1760 (2009)

67. Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, Vol. 82, pp. 70-77.

68. Mihara, M., Uchiyama, M. 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, Vol. 86, pp. 271-278.

69. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, pp. 265-275.

70. Kolmer John, A. 1960. Métodos de Laboratorio. Séptima parte (Anatomía patológica). Ed. Interamericana, 43, pp. 1087-1116.
71. DuBois., M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Vol. 28, pp. 350-356.
72. Brunton, L. 2012. *Goodman & Gilman* Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12a. Ed. Mc Graw-Hil.
73. Aybar, M.J., Sanchez Riera, A.N., Grau, A., and Sanchez S.S. 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol.*, Vol. 74, pp. 125-32.
74. Gray, A.M. and Flatt, P.R. 1997. Nature's own pharmacy: the diabetes perspective. *Proceedings of the Nutrition Society*, pp. 507-517.
75. Gray, A.M. and Flatt, P.R. 1998. Insulin releasing and insulin like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). *J. Endocrinol.*, pp. 259-266.
76. Yuan, Z., Puming, H., Jianhui, C., and Takeuchi, H. 1998. Hypoglycemics effect of water-soluble polysaccharide from *Auricula auricular-judae*. *Quel on genetic diabetic KK-Ay mice.*, pp. 1898-1903.
77. Ferrannini, E., Lanfranchi, A., Rohner-Jeanrenaud, F., Manfredini, G., and Van de Werve, G. 1990. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metabolism*, Vol. 39, pp. 1082-1088.
78. Hornbrook, K.R. 1970. Synthesis of liver glycogen in starved alloxan diabetic rats. *Diabetes*, Vol. 19, pp. 916-923.

79. Whitton, P.A. and Herms, D.A. 1975. Glycogen synthesis in the perfused liver of streptozotocin diabetic rats. *Biochem. J.*, Vol. 150, pp. 116-153.
80. Raju, J., Gupta, D., Rao, A.R., Yadava, P.K. and Baquer, N.Z. 2001. *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) seed powder improves glucose homeostasis in alloxan diabetic rat tissues by reserving the altered glycolytic, gluconeogenic and lipogenic enzymes. *Mol. Cell Biochem.*, Vol. 224, pp. 45-51.
81. Ashmore, J. and Weber, G. 1959. The role of hepatic glucose-6-phosphatase in the regulation of carbohydrate metabolism. In *Vitamins and Hormones*. Harris RS, Morrison GF., New York: s.n., Academic Press: Vol. 26, pp. 91-132.
82. Lavoie, L. and Van de Werve, G. 1991. Hormone stimulated glucose production from glycogen in hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. *Metabolism.*, Vol. 40, pp. 1031-1036.
83. Ahmed, O.M. 2005. The hypoglycemic effect of curcumin and esculetin and their probable mechanisms of action in streptozotocin diabetic albino rats. *J. Egypt Ger. Soc. Zool.*, Vol. 46, pp. 351-375.
84. Abdel-Moneim, A., Ahmed, O.M., Rawi, S.M. and Semmler, M. A. 2001. Studies on the hypoglycemic and hypolipidemic effects of glimepiride and some antidiabetic plants on streptozotocin diabetic rats. *J. Egypt Ger. Soc. Zool.*, Vol. 34, pp. 175-206.
85. Bustamante, S.E., Muñoz, J., Gallardo, R., Figueroa, H. and Morales, M. 2002. El extracto de *Vitis vinifera* revierte la disfunción vascular aórtica inducida por diabetes en ratas. Ciudad de Oviedo, España, Sociedad asturiana de fitoterapia, III *Congreso Internacional de Fitoterapia Técnicas Afines*, pp. 93-98.

86. Ravi, K., Ramachandran, B. and Subramanian, S. 2004. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci.*, Vol. 75, pp. 2717-2731.
87. Ugochukwu, N.H. and Babady, N.E. 2002. Antioxidant effects of *Gongronema latifolium* in hepatocytes of rat models of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Fitoterapia*, Vol. 73, pp. 612-620.
88. Meister, A. and Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Ann Rev. Biochem*, pp. 711-760.
89. Shan, X., Aw, T.Y., Jones, D.P. 1990. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther*, Vol. 47, pp. 61-71.
90. Dave, G.S., Kalia, K. 2007. Hyperglycemia induced oxidative stress in type-1 and type-2 diabetic patients with and without nephropathy. *Cell Mol. Biol.* (Noisy-le-grand), pp. 68-78. PMID: 17543235 [PubMed-indexed for MEDLINE].
91. Misbah, H., Abdul, A., Aziz and Aminudin, N. 2013. Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p. 13:118.
92. Ansarullah., Bharucha, B., Dwivedi, M., Laddha, N.C., Begum, R., Hardikar, A.A., and Ramachandran, A.V. 2011. Antioxidant rich flavonoids from *Oreocnide integrifolia* enhance glucose uptake and insulin secretion and protects pancreatic b-cells from streptozotocin insult. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p. 11:126.
93. Agnihotri, A. and Singh, V. 2013. Effect of *Tamarindus indica* linn. and cassia fistula linn. stem bark extracts on oxidative stress and diabetic conditions. *Acta Poloniae Pharmaceutical and Drug Research*, vol. 70, pp. 1011-1019.

94. Cicero, L.T., Chang Yenshou, Lin., Arlene, P., Bartolome, R. and Chen, Y.C. 2013. Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 33. Article ID 378657.
95. Talukder, F.Z., Khan, K.A., Uddin, R. and Jahan, N. 2012. *In vitro* free radical scavenging and anti-hyperglycemic activities of *Achyranthes aspera* extract in alloxan-induced diabetic mice. *Drug Discoveries and Therapeutics.*, Vol. 6, pp. 298-305.
96. International Diabetes Federation. <http://www.idf.org/>. [Online]
97. Pigman, W, and Horton D. 1970. The Carbohydrates, 2nd Edition, Academic Press Inc., London and New York, Vol. II A, p. 375 and Vol. II B, p.471
98. Yin, H., Wang, Y., Chen, T., Tang, H., Wang, M. 2010 Purification, characterization and immunomodulating properties of polysaccharides isolated from *Flammulina velutipes* mycelium. *Amer. J. Chin. Med.* 2010, 38:191-204
99. Wiater, A., Paduch, R., Pleszczyńska, M., Prochniak, K., Choma, A., Kandefer-Szerszeń, M., Szczodrak, J. 2010. A-(1-3)-D- Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol. Lett.* 2010, 33: 787-795

APÉNDICE I

Método de Lowry

APÉNDICE I

Método de Lowry

1. Preparación de la solución C.

1a. Preparación de la solución A:

Se colocaron 20 g de Na_2CO_3 con 4 g de NaOH y se aforó el matraz a 1L con agua libre de iones.

1b. Preparación de la solución B:

Se preparó una solución de 0.78 g de Cu_2SO_4 en 20 mL de agua libre de iones. Por otro lado, se preparó una solución con 1.34 g de tartrato de sodio y potasio disueltos en 20 mL de agua libre de iones.

La solución B se preparó mediante la mezcla de las soluciones anteriores, una vez mezcladas, se aforo el matraz a 1L con agua libre de iones.

1c. Preparación de la solución C:

Se mezclaron 50 mL de la solución A con 1 mL de la solución B.

II. Preparación del reactivo de Folin-ciocalteau.

Se mezclaron 10 mL del reactivo de Folin con 19 mL de agua libre de iones.

