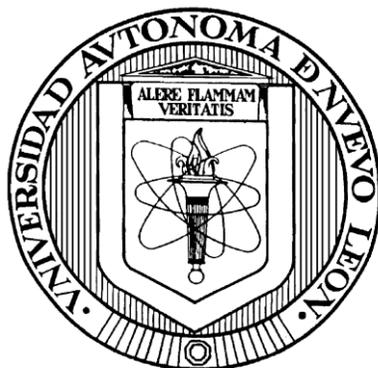


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS

CON ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA OBTENIDOS

A PARTIR DE *Lentinus lepideus*

Por

Q.F.B. ADRIANA ESTEFANÍA HERNÁNDEZ PEDRAZA.

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

Diciembre, 2013.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
ANTIDIABÉTICA OBTENIDOS A PARTIR DE *Lentinus lepideus***

Aprobación de la Tesis:

---

Dra. Patricia González Barranco  
Presidente

---

Dr. Edgar Abraham García Zepeda  
Secretario

---

Dra. Lourdes Garza Ocañas  
Vocal

---

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
 ANTIDIABÉTICA OBTENIDOS A PARTIR DE *Lentinus lepideus***

Revisión de la Tesis:

Comité tutorial

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

---

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

---

MC Myrna Laura Yeverino Gutiérrez

---

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

Adriana Estefanía Hernández Pedraza

Fecha de graduación: Diciembre de 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Químicas.

Título del Estudio: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA OBTENIDOS A PARTIR DE *Lentinus lepideus*.

Número de páginas: 133.

Candidato para la obtención del Grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Química y Farmacología de Productos Naturales.

**Propósito y Método del Estudio:** Desde tiempos ancestrales, los basidiomicetos han demostrado poseer diversas actividades terapéuticas. Recientemente, ciertas actividades se han confirmado científicamente como sus propiedades antidiabéticas, inmunomoduladoras y antioxidantes, por mencionar algunas. En México se encuentra una gran diversidad de basidiomicetos con estas y más actividades farmacológicas a las que no se les ha dado una investigación más formal y completa. En el presente trabajo de tesis, se evaluó la actividad antidiabética del extracto metanólico (Exto MeOH) de *Lentinus lepideus*. Los basidiomicetos fueron aislados y cultivados *in vitro* a partir de muestras obtenidas previamente de basidiomicetos silvestres provenientes de la sierra de Galeana, de estos basidiomicetos se obtuvo biomasa y a esta se le realizó una extracción con metanol. El Exto MeOH obtenido se evaluó biológicamente al administrarse a dos grupos de ratas macho *Wistar*, normoglucémicas y diabetizadas con estreptozotocina. Además, se llevó a cabo el fraccionamiento del Exto MeOH mediante la utilización de cromatografía en columna empleando hexano, acetato de etilo, metanol y agua en orden creciente de concentración. Las fracciones principales fueron sometidas a subfraccionamiento y purificación de sus constituyentes mediante diversas técnicas cromatográficas y de cristalización. Finalmente, uno de los compuestos aislados fue sometido a evaluación *in vivo* en ratas diabetizadas con estreptozotocina. El presente trabajo de tesis esta orientado hacia la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diabetes.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se evaluó la actividad antidiabética del Exto MeOH de *Lentinus lepideus* y los resultados mostraron su efectividad como agente antihiper glucemiante debido a que disminuyó la glucosa plasmática en el grupo de ratas diabetizadas. En dicha valoración, se utilizó como control positivo glibenclamida. En ratas normoglucémicas no se logró una reducción considerable en la glucosa plasmática. Posteriormente, se realizó la evaluación biológica del compuesto AH-4 obtenido del fraccionamiento del Exto MeOH, tanto en ratas normoglucémicas como diabetizadas, el cual mostró buenos resultados como agente antihiper glucemiante, en comparación con los controles. Por otro lado, a este mismo compuesto AH-4, se le realizó un ensayo de alfa-glucosidasa, donde los resultados demostraron una alta actividad inhibitoria de la enzima, demostrando su efectividad como agente antidiabético y sugiriendo a su vez, que este pudiera ser uno de los mecanismos de acción antidiabética.

FIRMA DEL ASESOR DE TESIS:

---

Dra. Patricia González Barranco

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas, a la UANL, a CONACyT, a PAICYT y PROMEP, por todo el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

Gracias a todas las personas que hicieron posible la realización de la presente tesis, especialmente:

A mi asesora, la Dra. Patricia González Barranco, por compartir tus conocimientos conmigo, por tu tiempo y valioso apoyo, por tu guía y por todo lo que he llegado a aprender de tí, de verdad gracias.

A la Dra. Lourdes Garza Ocañas, por permitirme trabajar bajo su tutela en el Departamento de Farmacología y Toxicología, de la UANL.

Al Dr. Abraham García, por tu tiempo, apoyo, conocimiento, sugerencias y consejos durante el desarrollo de esta tesis.

Al comité tutorial, Dra. Lucía Gpe. Cantú Cárdenas, Dra. María Elena Cantú Cárdenas y MC Myrna Laura Yeverino Gutiérrez, por sus valiosas contribuciones para la realización y revisión de esta tesis.

Agradezco también a la Dra. María del Rayo Camacho Corona, por permitirme trabajar en el laboratorio de Química de Productos Naturales de la UANL. Al M.V.Z. Gilberto Arévalo, a los señores Armando, Gabriel y Luciano, del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UANL, por su apoyo con el manejo de los animales de laboratorio. A la MC Alejandrina Acosta Huerta y Antonio Nieto Camacho, de la Facultad de Química de la UNAM, por el apoyo en la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear y del ensayo de alfa-glucosidasa, respectivamente.

## DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis primero a Dios, por permitirme llegar a este momento de mi vida, por darme las fuerzas, las herramientas, paciencia, valentía, coraje y todos los elementos que necesité para cumplir con esta meta.

A mi familia, mis papás Ana Isabel y Alberto, y a Marissa, Beto, Ingrid y Sofía por su amor, paciencia, fe, apoyo, palabras de aliento... por todo, basta con decir que agradezco a Dios por dejarnos coincidir en este bello camino llamado vida; por ustedes, hoy puedo escribir estas páginas. Los amo. A Celestina y a Fernando, por creer tanto en mí.

A mis amigos, que hicieron ameno el trayecto y, sobre todo, por su apoyo: Adriana Romo, Aldo Clemente, Ana Catalina Rodríguez, Ángel Arteaga, Argentina González, Diana Castillo, Diana Facundo, Diana Romero, Eder Arredondo, Enrique Cantú, Esther Baltazar, Fabiola Montelongo, Iris Larissa Miranda, Jackeline Lara, Karina Navarro, Laura Villarreal, Rolando Delgado, Sofía Rodríguez, Tatiana Montaña, Teresa Vargas, Zianya Bautista. Los quiero mucho.

A tí, mi directora de tesis, Dra. Patricia González, asesora, maestra, amiga, confidente, consejera. Gracias por tu enorme paciencia y fe en mí; porque siempre que dudé de mí, estuviste ahí para mostrar mi error al hacerlo. Para tí, un profundo agradecimiento y mi más grande admiración, como asesora y como persona.

A la Dra. Lucía Cantú, gracias por sus invaluable consejos, enseñanzas y por todo su apoyo.

A las y los chicos de servicio social en los laboratorios de Biofarmacia y Química de Productos Naturales con quienes trabajé en su momento Caro, Ale, Diana, Carlos, Lalo, Yolanda, Miroslava, Valeria, Fernando, Judith, Monse.

Y, en general, a todas las personas que estuvieron durante el desarrollo de esta tesis de maestría. Mi más sincero agradecimiento por cruzarse en mi camino.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	20
1.1 Diabetes mellitus. ....	20
1.1.1 Definición. ....	20
1.1.2 Clasificación. ....	21
1.1.3 Complicaciones. ....	22
1.1.4 Factores de predisposición. ....	24
1.1.5 Prevalencia de la diabetes en México. ....	24
1.1.6 Prevalencia a nivel mundial. ....	26
1.1.7 Importancia social y económica. ....	27
1.1.8 Tratamiento no farmacológico ....	28
1.1.9 Tratamiento farmacológico. ....	29
1.2 Basidiomicetos. ....	31
1.2.1 Clasificación y características del reino fungi. ....	33
1.2.2 Los basidiomicetos en el mundo. ....	35
1.2.3 Actividades farmacológicas de algunos basidiomicetos. ....	35
1.3 Antecedentes. ....	38
1.3.1 Estreptozotocina (STZ) ....	48
1.4. Justificación .....	51

1.5	Hipótesis .....	51
1.6	Objetivos.....	52
1.6.1	Objetivo general. ....	52
1.6.2	Objetivos específicos. ....	52
	MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
2.1	Material.....	53
2.1.1	Material biológico. ....	53
2.1.2	Material y equipo.....	54
2.1.3	Reactivos. ....	56
2.2	MÉTODOS.....	58
2.2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de macromicetos.....	58
2.2.2	Fraccionamiento del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> . ....	60
2.2.3	Evaluación de la actividad biológica de <i>L. lepideus</i> . ....	62
2.2.4	Evaluación de la actividad moduladora de los niveles glucémicos en ratas. Evaluación del Exto MeOH. ....	64
2.2.5	Evaluación de la actividad biológica de compuesto(s) puro(s) obtenido(s) a partir del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .....	70
2.3	Elucidación del (los) compuesto(s) puro(s) obtenido(s) a partir del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> . ....	75
2.3.1	Elucidación estructural mediante el uso de resonancia magnética nuclear. ....	75

2.4 Ensayo enzimático del compuesto AH-4, obtenido de las fracciones F71-127.....	75
2.4.1 Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa. ....	75
2.5 Análisis estadístico. ....	77
RESULTADOS.....	78
3.1 Material fúngico. ....	78
3.1.1 Obtención de cepas para el estudio.....	78
3.2 Crecimiento <i>in vitro</i> del basidiomiceto.....	78
3.2.1 Crecimiento de <i>L. lepideus</i> en medio sólido.....	78
3.2.2. Crecimiento de <i>L. lepideus</i> en medio líquido.....	79
3.3. Estandarización del modelo animal de diabetes.....	79
3.3.1 Modelo animal de diabetes. ....	79
3.3.2 Réplica del modelo animal de diabetes.....	82
3.4 Evaluación de la actividad biológica del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .....	84
3.4.1 Evaluación en ratas normoglucémicas diabetizadas con STZ. ....	84
3.4.2 Evaluación de la actividad antidiabética del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> en ratas normoglucémicas. ....	88
3.5 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos puros obtenidos a partir de <i>L. lepideus</i> . ....	89
3.5.1. Obtención del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> . ....	89

3.5.2. Compuesto AH-2, obtenido de la fracción F17.....	91
3.5.3 Compuesto AH-5, obtenido de las fracciones F36-44. ....	99
3.5.3. Compuesto AH-4, obtenido de las fracciones F71-127. ....	107
3.6 Evaluación de la actividad biológica del compuesto AH-4 obtenido a partir del Exto MeOH de <i>L. lepidus</i> . ....	110
3.6.1 Evaluación en ratas normoglucémicas diabetizadas con STZ. ....	110
3.6.1.2 Evaluación de la actividad antidiabética del compuesto AH-4 obtenido del Exto MeOH de <i>L. lepidus</i> en ratas diabetizadas.....	112
3.6.2 Evaluación de la actividad antidiabética del compuesto AH-4 obtenido del Exto MeOH de <i>L. lepidus</i> en ratas normoglucémicas.....	114
3.8 Ensayo enzimático de inhibición de alfa-glucosidasa del Exto MeOH de, de <i>L. lepidus</i> , y de los compuestos AH-2, AH-4 y AH-5.....	117
DISCUSIÓN .....	118
CONCLUSIONES.....	124
PERSPECTIVAS.....	126
REFERENCIAS.....	127

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Partes básicas de un basidiomiceto.	33
2	Cadena repetitiva del lentinan. Tomada de Y. Zhang et al. 2011	41
3	Procedimiento general de trabajo para la obtención, purificación y evaluación de los compuestos obtenidos del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .	63
4	Hidrólisis de <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiraósido con $\alpha$ -glucosidasa.	77
5	Cálculos del porcentaje de inhibición enzimática de $\alpha$ -glucosidasa (DO = dispersión óptica).	77
6	Crecimiento de <i>L. lepideus</i> a distintos tiempos de incubación en medio Melin-Norkrans modificado. (A) A cuatro semanas de incubación en medio sólido; (B) a dos meses de crecimiento en medio líquido.	80
7	Variación de glucosa plasmática del modelo animal de diabetes por STZ.	82
8	Variación de glucosa plasmática de la réplica del modelo animal de diabetes por STZ.	84
9	Concentraciones de glucosa plasmática expresadas en mg/dL, de las ratas sometidas a diabetización para la evaluación del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .	86
10	Variaciones de las concentraciones de glucosa plasmática en mg/dL de los grupos de las dosis de Tween 80, glibenclamida y Exto MeOH a 30 mg/kg, en la evaluación del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> en ratas diabetizadas, con respecto a los valores originales de glucosa plasmática.	88
11	Variaciones de las concentraciones de glucosa en mg/dL de los grupos de las dosis de Tween 80, glibenclamida y Exto MeOH a 30 mg/kg en la evaluación del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> en ratas normoglucémicas.	89
12	Estructura del <i>p</i> -metoxicinamato de metilo (AH-2).	93
13	Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), del compuesto AH-2.	97

14	Espectro de RMN DEPT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto AH-2.	98
15	Espectro de RMN-13C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto AH-2.	99
16	Estructura del ergosterol (AH-5).	100
17	Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), del compuesto AH-5.	102
18	Espectro de RMN-13C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto AH-5.	106
19	Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de compuesto AH-4.	107
20	Espectro de RMN-13C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de compuesto AH-4.	109
21	Variación de glucosa plasmática durante la diabetización de las ratas para la evaluación del compuesto AH-4.	110
22	Valores de glucosa plasmática (mg/dL) obtenidos en el día dos de evaluación del compuesto AH-4.	112
23	Variaciones de las concentraciones de glucosa (mg/dL) de los grupos de ratas evaluados durante el segundo día con AH-4 en ratas diabetizadas.	115
24	Variaciones de las concentraciones de glucosa (mg/dL) de los grupos de ratas evaluados durante el segundo día con AH-4 en ratas normoglucémicas.	117

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Recopilación de basidiomicetos con actividad farmacológica comprobada y los principales componentes a los que les atribuyen tales propiedades	37
2	Basidiomicetos recopilados por Kamal y Li.	42
3	Variaciones de glucosa plasmática en los grupos controles, de glibenclamida y de medio de cultivo de <i>Coriulus versicolor</i> administrado en ratones ICR.	44
4	Actividades de las fracciones acuosas I y II de <i>L. lepideus</i> obtenidos por Jung y colaboradores (2008)	47
5	Composición del medio de cultivo Melin Norkrans modificado	60
6	Peso, cantidad de STZ y volumen de solución de trabajo administrado a ratas macho <i>Wistar</i> del modelo de diabetización en animales.	64
7	Peso, cantidad de STZ y volumen de solución de trabajo administrado a ratas macho <i>Wistar</i> de la réplica del modelo de diabetización en animales.	65
8	Dosis de STZ administrada a ratas normoglucémicas durante la evaluación del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .	68
9	Dosis de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis de Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> administradas a ratas diabetizadas.	69
10	Dosis de vehículo (Tween 80), glibenclamida y el Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> a distintas concentraciones en ratas normoglucémicas.	70
11	Dosis de STZ administrada a ratas normoglucémicas durante la evaluación del compuesto AH-4 del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .	72
12	Cantidades de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis del compuesto SB-AE obtenido a partir del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> administrada a ratas diabetizadas.	73
13	Cantidades de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis del compuesto AH-4 obtenido a partir del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> administradas a ratas normoglucémicas.	75

14	Concentración de glucosa plasmática expresada en mg/dL, a distintos tiempos en el modelo animal de diabetes	81
15	Concentración de glucosa plasmática expresada en mg/dL a distintos tiempos en la réplica del modelo de diabetes en animales.	83
16	Fracciones principales obtenidas a partir de la C.C. del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .	90
17	Fracciones seleccionadas para ser analizadas por RMN, obtenidas a partir del Exto MeOH de <i>L. lepideus</i> .	92
18	Datos cromatográficos y físicos del compuesto AH-2, obtenido de la fracción F17, revelados con sulfato cérico amoniacal.	93
19	Datos espectrométricos del $\rho$ -metoxicinamato de metilo.	96
20	Datos cromatográficos y físicos del compuesto AH-5, recuperado de las fracciones F36-44.	101
21	Datos espectroscópicos del ergosterol.	104
22	Datos cromatográficos y físicos del compuesto AH-4.	108
23	Concentraciones promedio de glucosa plasmática de las ratas sometidas a diabetización para la evaluación del compuesto AH-4. Los valores se expresan en mg/dL.	113
24	Resultados de los valores obtenidos del peso (g) en el proceso de diabetización para la evaluación del compuesto AH-4.	114
25	Valores de glucosa plasmática (mg/dL) obtenidos en el día dos de evaluación del compuesto AH-4.	114
26	Valores de glucosa plasmática (mg/dL) obtenidos en el día dos de evaluación del compuesto AH-4.	116
27	Resultados obtenidos del ensayo de inhibición enzimática de $\alpha$ -glucosidasa de los compuestos evaluados.	118

## NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
AcOEt	Acetato de Etilo
ADA	American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
CDC	Centers of Disease Control (Centro de Control de Enfermedades)
cols.	Colaboradores
C.C.	Columna Cromatográfica
CCF	Cromatografía en Capa Fina
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteínas de Baja Densidad)
DM	Diabetes Mellitus
DPP-IV	Dipeptidil Peptidasa Tipo IV
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
Exto MeOH	Extracto Metanólico
g	Gramos
g/kg	Gramos/Kilogramo
g/L	Gramo/Litro
GLP-1	Péptido-1 Tipo Glucagón
GLUT4	Transportador de Glucosa 4

GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos)
Gpo.	Grupo
Hex	Hexano
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
IgM	Inmunoglobulinas M
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática
iNOS	Inducible Nitric Oxide Sintase (Óxido Nítrico Sintasa Inducible)
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IP	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
<i>L. lepideus</i>	<i>Lentinus lepideus</i>
M	Molar
MBR	Modifiers of Biological Response (Modificadores de la Respuesta Biológica)
MeOH	Metanol
mg/dL	Miligramos/Decilitro
mg/kg	Miligramos/Kilogramo
$\mu$ L	Microlitro
NaCl	Cloruro de Sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Calcio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPAR- $\gamma$	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (Receptor Gamma Activado de Proliferación de Peroxisomas)

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
STZ	Estreptozotocina
SUR	Sulfonil Urea Receptor (Receptor Específico de Sulfonilurea)
t	Tiempo
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Ultravioleta

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Diabetes mellitus.**

##### **1.1.1 Definición.**

Según la NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus (DM), este trastorno está definido en México como una “enfermedad sistémica, crónico–degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales. Se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas”. Clínicamente, dichas anomalías resultan en complicaciones que incluyen daños neuropáticos y

trastornos micro- y macrovasculares, como el daño en los vasos sanguíneos periféricos, que pueden derivar en amputaciones, ceguera e hipertensión, entre otros <sup>1, 2, 3</sup>.

### **1.1.2 Clasificación.**

La Sociedad Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) clasifica a la diabetes como <sup>4, 5, 6</sup>:

- a) Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), antes conocida como insulino dependiente, que es causada por una destrucción de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos de Langerhans y se caracteriza por la deficiencia de insulina.
- b) Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), es aquella en la que se presenta una deficiencia en la secreción de insulina además de resistencia por parte de los tejidos dependientes de glucosa, como músculo, hígado y tejido adiposo, para captar la insulina, resultando en el manejo ineficiente de la glucosa.
- c) Otros tipos específicos de diabetes, asociados con síntomas o síndromes identificables, como los defectos genéticos en la función de las células  $\beta$  del páncreas o en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exócrino, las endocrinopatías, inducción por fármacos o químicos, infecciones, formas poco comunes de diabetes mediadas por el sistema inmune y otros síndromes genéticos asociados con la diabetes.

d) Diabetes gestacional, que afecta solamente a las mujeres que se encuentran en etapa de gestación y comúnmente desaparece al término del embarazo. Si no se trata adecuadamente y a tiempo, puede traer consecuencias indeseables tanto para la madre como para el producto, como el desarrollo temprano de diabetes en el niño o que la madre sea diabética aún después de terminado el embarazo.

### **1.1.3 Complicaciones.**

Según la adherencia del paciente al tratamiento, tanto farmacológico como no farmacológico, pueden o no presentarse complicaciones, como la cetoacidosis y el estado de hiperglucemia hiperosmolar. En la cetoacidosis, la glucosa es sustituida por grasa como fuente de energía, en la medida que esta última se descompone, los ácidos cetónicos se acumulan en la sangre y orina; a niveles altos, estos ácidos son tóxicos. Se produce además una hiperglucemia, con valores de glucosa plasmática superiores a los 300 mg/dL, debido a que la falta de insulina provoca acumulación de glucosa plasmática <sup>4, 5, 7</sup>.

A su vez, el estado hiperosmolar hiperglicémico, antes conocido como coma hiperosmolar no cetónico, consiste en un estado en el que el paciente presenta una excesiva hiperglicemia, además de una marcada hiperosmolaridad. Fisiopatológicamente se debe a una ausencia relativa de insulina, lo que desencadena una baja en el aprovechamiento de glucosa por parte del músculo

esquelético; esto inicia mecanismos compensadores como gluconeogénesis y glucogenólisis, para incrementar la producción de glucosa necesaria para el funcionamiento del músculo lo que conlleva a un aumento en la glucosa circulante y ocasiona una diuresis osmótica, sin la presencia de cuerpos cetónicos <sup>8, 9, 10</sup>.

Es conocido que la DMT2 trae consigo el riesgo de desarrollar, a largo plazo, retinopatías, cataratas, glaucoma, nefropatía, problemas cardíacos, eventos cerebrovasculares, hipertensión arterial, enfermedad arterial periférica, insuficiencia renal y enfermedades del sistema nervioso central, que incluyen a las neuropatías, enfermedades mentales y dérmicas, problemas nerviosos (como depresión o ansiedad), digestión lenta de los alimentos, disfunción eréctil y síndrome del túnel carpiano, entre otras, causadas por daños a nivel microvascular y macrovascular; en ambos niveles se involucran factores como el daño en el endotelio capilar, el sistema de coagulación, eritrocitos, y lípidos. Además, el daño a nivel bioquímico puede traer como complicación la hiperglucemia, producto de la disminución en la oxidación de glucosa y la reducción de su depósito como glucógeno, aunado al incremento de la producción hepática de este último <sup>2, 3, 7, 11</sup>.

#### **1.1.4 Factores de predisposición.**

Los factores de riesgo más comunes asociados a esta enfermedad son la obesidad y/o sobrepeso, hipertensión arterial, sedentarismo, dislipidemias, tabaquismo, ingesta descontrolada de carbohidratos y grasas saturadas, herencia, edad, peso mayor a cuatro kilogramos (kg) al nacer y la raza, pues se sabe que los latinos tienen una prevalencia mayor del 10 %, según estudios realizados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC, según sus siglas en inglés)<sup>3, 4, 12</sup>.

#### **1.1.5 Prevalencia de la diabetes en México.**

La DMT2 es considerada uno de los padecimientos no transmisibles más peligrosos ya que, junto con los problemas cardiovasculares y el cáncer, ocupó el primer lugar de defunciones en el año 2010, al reportarse más de 83,000 muertes<sup>7, 14, 15</sup>.

El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) registró en el año 2011 que del total de defunciones a nivel nacional, el 13.7% de los fallecimientos fueron a causa de la diabetes y de sus complicaciones; mientras que en Nuevo León el porcentaje fue de 10%. En los datos de la Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) 2012, se identificaron a más de 6.4 millones de adultos con diabetes, es decir, 9.2% de la población adulta en el país cuenta ya con un diagnóstico de diabetes y la prevalencia se incrementa conforme aumenta la edad. Además, se observó que la mayor incidencia en el país se identifica en el

Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Estado de México, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí <sup>13, 15</sup>.

Es importante señalar también que en México gran parte de la población que padece diabetes se compone de personas que cuentan con recursos limitados y factores sociales que complican el control ideal de la enfermedad, como se reporta en un trabajo realizado en el año 2007, donde se declara que es la enfermedad más frecuente en personas de la tercera edad, en grupos sociales donde la escolaridad es baja y donde los ingresos son mínimos, teniendo uno o dos salarios mínimos como sustento. Además, la población que es más propensa a tener diabetes es aquella que se encuentra en las zonas urbanas de regiones del norte del país; personas que cuentan con un historial familiar de diabetes, con sobrepeso u obesidad y acumulación de grasa en el abdomen, también con problemas de hipertensión arterial, hipercolesterolemia, enfermedades renales y microalbuminuria; si ingieren bebidas alcohólicas y/o fuman. Todos estos factores hacen del individuo un excelente candidato a padecer en un futuro DM2 <sup>6, 7, 17, 19</sup>.

Los cambios demográficos y epidemiológicos presentes en el país, influyen sobre el estilo de vida social de la población mexicana, ya que la economía es un factor determinante para la vida cotidiana de ciertos sectores poblacionales; las personas se ven en la necesidad de modificar sus hábitos de alimentación o descanso, por ejemplo, para tener una mejor calidad de vida. Esto se ve reflejado

en que los recesos se ven disminuidos en tiempo, por lo que se demanda una alimentación que pueda consumirse en el menor tiempo posible, lo que conlleva a la ingesta de alimentos procesados que regularmente cuentan con un mayor aporte calórico y con menor calidad nutricional, lo que se deriva en sobrepeso u obesidad y -eventualmente- en diabetes.

### **1.1.6 Prevalencia a nivel mundial.**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) estiman que hay casi 26 millones de niños y adultos que padecen diabetes tan solo en los Estados Unidos, mientras que en México la cifra aumentó a más de seis millones en el 2012. En el año 2010 se estimó que había 285 millones de personas con esta enfermedad, mientras que se considera que cada año, siete millones más la adquieren, según la OMS. Además, el CDC ha declarado que la diabetes es la principal causa de enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares, amputaciones no traumáticas y falla renal, entre otras complicaciones. En estudios recientes realizados en Estados Unidos en personas con DMT2 mayores de veinte años de edad, se pudo notar que las personas de color e hispanos, principalmente mexicanos y sudamericanos, son más susceptibles a desarrollar dicha enfermedad<sup>3, 4, 11, 15</sup>.

### **1.1.7 Importancia social y económica.**

La diabetes es un padecimiento en el que el tratamiento, tanto de la enfermedad como de sus complicaciones, genera un costo de millones de dólares en el mundo. Tan solo en los Estados Unidos, en el año 2007 el manejo de la enfermedad tuvo un costo total de alrededor de \$174 millones de dólares, donde se gastaron \$116 millones de dólares en costos médicos directos, los cuales incluyen visitas al médico y gastos para tratamiento; mientras que los \$58 millones restantes fueron para los costos indirectos, como invalidez, incapacidad productiva y morbilidad prematura <sup>4, 11</sup>.

El costo generado en México en el año 2006 por diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y obesidad, superó los 225 millones de pesos, de los que el 40.6% fue destinado únicamente a DM, entre gastos hospitalarios, de consultas médicas, de suministros médicos y farmacéuticos, además de programas de salud pública <sup>16</sup>.

Además, por las complicaciones que conlleva esta enfermedad la catalogan como la causa principal de ingreso hospitalario en el sistema nacional de salud popular y de atención médica de consulta externa, siendo la enfermedad que causa mayor gasto, con casi el 20%. La diabetes es la primera causa de ceguera adquirida y de amputaciones no traumáticas de miembros inferiores <sup>14, 15, 16</sup>.

El Instituto Nacional de Salud Pública de México (INSP) reporta que, de las complicaciones por paciente con más notificaciones por parte de diabéticos con diagnóstico previo, el 47.6% fue por disminución de la visión y 38% presentó ardor, dolor o pérdida de sensibilidad en los pies. Dentro de los reportes considerados como de gravedad, se consideró a las amputaciones de miembros, diálisis e infartos al miocardio<sup>2, 3, 11, 17</sup>.

### **1.1.8 Tratamiento no farmacológico**

Las principales medidas de control no farmacológico para la DMT2 se centran en la dieta y el ejercicio. Se recomienda que el paciente disminuya o evite, en la medida de lo posible, el consumo de grasas saturadas, carbohidratos, alcohol y tabaco. Las anteriores recomendaciones deben ir a la par de un control regular del peso y de niveles de glucosa plasmática, además de la prevención de posibles focos de complicaciones de la enfermedad.

Es importante subrayar que el aumento en el gasto calórico y la reducción de la ingesta energética deben ir en conjunto para obtener resultados más efectivos, duraderos y evidentes.

### 1.1.9 Tratamiento farmacológico

Para el control farmacológico de la diabetes, según los diferentes esquemas de salud, nacionales e internacionales, los principales grupos de fármacos que se emplean se enlistan a continuación <sup>1, 3, 4, 5</sup>:

a) Sulfonilureas.

Las sulfonilureas se unen a un receptor específico de sulfonilurea (SUR, por sus siglas en inglés) en las células  $\beta$  del páncreas y a esta unión se le acopla una molécula de ATP (adenosin trifosfato) que es dependiente del canal de los iones de potasio, lo que causa disminución de la salida de potasio y despolarización de la membrana. Los canales dependientes de calcio se abren y permiten la entrada de iones calcio. Al aumentar la concentración de calcio, se realiza una translocación de los gránulos secretorios de insulina en la superficie celular y ocurre exocitosis de los mismos, lo que ocasiona una elevada concentración de insulina desde el páncreas, que se desplaza vía vena portal y suprime a su vez, la secreción de glucosa hepática. Ejemplos de este grupo son glibenclamida, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, glipizida y glimepirida.

b) Biguanidinas.

Mejoran la sensibilidad de captación de la insulina por parte de los tejidos hepático y periférico (músculo), permitiendo un incremento en la recaptación de glucosa por parte de estos. El mecanismo de acción exacto de este grupo de fármacos no se conoce por completo, pero se sabe que la actividad de la proteína quinasa adenosin 5-monofosfato, el aumento de la actividad de la tirosina quinasa

y el transportador GLUT4 participan en él. En esta familia se encuentra la metformina.

c) Inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa.

Ejemplos de este grupo de fármacos son la acarbosa y el miglitol. La familia de enzimas de  $\alpha$ -glucosidasas como sucrasa, maltasa, isomaltasa y lactasa, hidrolizan los almidones complejos que se encuentran en la luz del intestino delgado en oligosacáridos y a estos en monosacáridos como la glucosa, que se absorben rápidamente. Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa inhiben competitivamente a las enzimas antes descritas, causando un retraso en el rompimiento de carbohidratos complejos a glucosa, lo que da como resultado una reducción de los niveles plasmáticos de glucosa posprandial.

d) Tiazolidinedionas.

Estos fármacos reducen la resistencia a la insulina periférica a través de la activación del Receptor Gamma Activado Proliferador de Peroxisomas (PPAR- $\gamma$ ), que es un receptor nuclear encargado de regular la transcripción de algunos genes que responden a la insulina para regular el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Sus fármacos más representativos son la pioglitazona y la rosiglitazona.

e) Inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV).

Este grupo ocasiona el incremento en la duración de la vida media de un péptido parecido al glucagón producido endógenamente. Los inhibidores de la DPP-IV reducen parcialmente el glucagón elevado posprandialmente y estimulan la

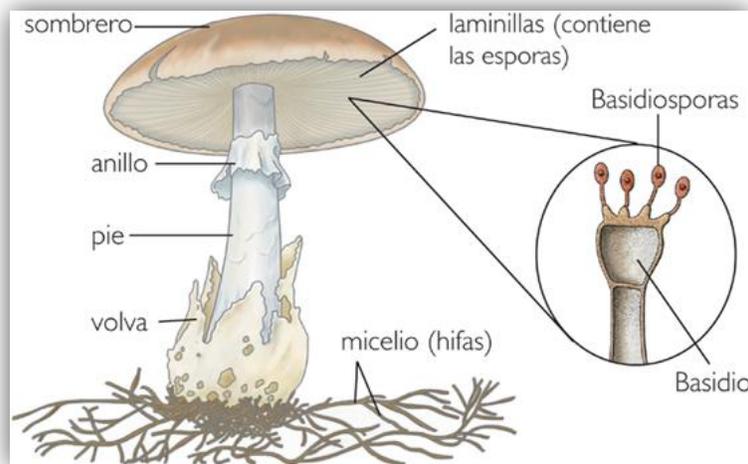
secreción de la insulina dependiente de glucosa. Como estos agentes bloquean casi el 100 % de la actividad de la enzima DPP-IV por lo menos 12 horas, los valores del péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) se acercan a aquellos alcanzados por una persona promedio no diabética. Sus fármacos más distintivos son la vildagliptina y la sitagliptina. Se administran en terapia coadyuvante junto a las biguanidinas, como la metformina.

Todos los grupos farmacológicos anteriormente descritos, aunque son fundamentales en el tratamiento de la diabetes, presentan reacciones adversas y efectos secundarios indeseables, como hipertensión, aumento de peso, edema, hipersensibilidad a la fórmula, además de malestares gástricos, como náuseas y diarrea; dolor abdominal, hipoglucemia, pérdida del apetito (anorexia), aumento en LDL, anemia, dolor de cabeza, mareos, debilidad, esto por mencionar solo algunos ejemplos <sup>2, 5, 18, 19, 20</sup>.

## **1.2 Basidiomicetos.**

Los hongos pertenecen al reino Fungi y una gran cantidad de ellos puede llegar a tener propiedades terapéuticas y comestibles. Lo que se conoce comúnmente como hongos o setas, corresponde a los cuerpos fructíferos que pertenecen a basidiomicetos y algunos ascomicetos. Estos cuerpos fructíferos son estructuras reproductivas que crecen por encima del suelo para liberar esporas <sup>23, 24, 25</sup>.

El ejemplo de la estructura clásica de un basidiomiceto se muestra en la Figura 1, donde el cuerpo principal de un hongo es una red parecida a hilos llamada micelio, que crece bajo tierra o en la madera del tronco de un árbol. El micelio es una red de células interconectadas que permean hacia el suelo y producen cuerpos fructíferos u hongos, cuando se encuentran bajo condiciones óptimas de humedad, temperatura y nutrición; además, el micelio es el encargado de romper con el complejo de moléculas, como la celulosa y el lignano en los árboles, y absorber los nutrientes de su entorno <sup>23, 26</sup>.



**Figura 1.** Partes básicas de un basidiomiceto <sup>52</sup>.

Los hongos no son fotosintéticos, por lo que se alimentan de los nutrimentos que tienen a su alcance en el medio en que se encuentran por absorción, una característica que los distingue particularmente de las plantas, debido a que estas se nutren por fotosíntesis; mientras que difieren de los animales en que su

nutrición es por ingestión. La membrana celular de los hongos consiste de quitina, quitosan, glucanos y manano. Debido a que los hongos tienen en su parte o fracción lipídica una predominante cantidad de ácidos grasos insaturados, como el ácido linoléico, pueden llegar a ser buen alimento para usarse en dietas donde se requiere perder peso y mantener una buena salud del sistema cardiovascular <sup>21</sup>.

### **1.2.1 Clasificación y características del reino fungi.**

La siguiente es la clasificación taxonómica por *filum* del reino Fungi, reconocida en la micología actual <sup>22, 23</sup>:

a) Ascomicota o ascomicetos: es el *filum* más grande, incluye a las levaduras, oídios, mohos, colmenillas y a las trufas. Se encuentran como saprófitos de restos de plantas y animales, y pueden ser patógenos de los mismos. Son de reproducción sexual y asexual.

b) Basidiomicota: también conocidos como basidiomicetos o macromicetos, forman más del 37% de los hongos descritos en el mundo, con más de 30,000 especies. Tienen diversas formas, conocidas como hongos o setas, boletus, bejín, hongos o setas venenosas, hongos donde anidan las aves, hongos de jalea, hongos de soporte o estantes, hongos de herrumbre, hongos de tizón. La mayoría de los miembros del *filum* son saprófitos, causando descomposición de basura, madera o estiércol, por ello a algunos se les llama hongos de podredumbre blanca. La reproducción es típicamente sexual.

c) Chytridiomycota o citridos: crecen como saprófitos en plantas o restos de animales o como parásitos en células de organismos microscópicos, como las algas. Son mayormente acuáticos y de tamaños diminutos, siendo detectados únicamente con el microscopio, en células y tejidos colonizados por estos. Su pared se compone principalmente de quitina y glucanos. Tienen reproducción asexual. Suelen ser endobióticos (viven enteramente dentro de las células de su hospedero) o epibióticos (los cuales reproducen sus propios órganos sexuales en la superficie de su hospedero o sobre materia orgánica muerta y absorben su alimento a partir de estas). Ejemplos de este *filum* son *Chytridiomycetes* y *Monoblepharidomycetes*.

d) Glomeromicota: son los llamados hongos arbusculares micorrizales, aunque anteriormente fueron considerados dentro de los zigomicotas, estudios recientes de ARN demostraron que no están relacionados. A este pertenecen: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Archaeospora*, *Glomus*, *Paraglomus*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Son principalmente micorrizas y ninguno crece en cultivos debido a que necesitan de una planta que funja como su hospedera. Crecen principalmente en las raíces de las cortezas celulares y producen vesículas, que funcionan de reservorios de alimentos.

e) Zigomicota: se caracterizan por la presencia de la hifa cenocítica. La reproducción asexual típica es por medio de la motilidad del esporangio y la sexual por la copulación gametangial, que resulta en la formación de zigosporas con un zigosporangio. Contienen quitina, quitosán y ácido poliglucurónico. Sus formas de

nutrición van desde lo saprófito a parásitos débiles de plantas y animales; algunos ejemplos son: *Mucor*, *Pilobolus*, *Mortierell*, entre otros.

### **1.2.2 Los basidiomicetos en el mundo.**

Desde hace años, los basidiomicetos –también llamados macromicetos– comestibles o no comestibles, han tenido importancia en el campo de la alimentación y de la salud debido a sus propiedades nutrimentales y terapéuticas. Se sabe que, desde hace siglos, diversas culturas mesoamericanas como los Mayas y Aztecas en Latinoamérica, o culturas orientales ubicadas en China, Rusia, Japón, Corea y en países como Estados Unidos y Canadá, ya utilizaban estos hongos como parte de ritos de sanación. También hay registro de que algunas sociedades africanas les han dado diversos usos curativos<sup>21, 26, 27</sup>.

### **1.2.3 Actividades farmacológicas de algunos basidiomicetos.**

Algunas de las propiedades que se les atribuyen a los basidiomicetos son las inmunológicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antifibróticas, antioxidativas, antifúngicas, antivirales, antiparasitarias y antibacterianas; así como también han sido utilizados para proteger al organismo contra artritis, insomnio, bronquitis, asma, úlceras gástricas y desórdenes cardiovasculares (al actuar como antihipertensivos y antihiperlipidémicos)<sup>23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33</sup>.

De los macromicetos que son mayormente cultivados en el mundo, encontramos a los basidiomicetos de los géneros *Ganoderma* y *Lentinus*, debido a que además de un sabor agradable al cocinarlos, se les han encontrado propiedades terapéuticas, como las inmunomoduladoras, antimicrobianas, citoprotectoras, antidiabéticas, antialérgicas, antivirales, antitumorales y hepatoprotectoras, entre otras<sup>28, 29, 30, 31, 32, 33</sup>.

A continuación (ver Tabla 1), se muestran algunos ejemplos de compuestos presentes en los basidiomicetos a los que se les ha comprobado alguna propiedad farmacológica.

**Tabla 1** Recopilación de basidiomicetos con actividad farmacológica comprobada y los principales componentes a los que les atribuyen tales propiedades<sup>23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 37, 40, 48, 50</sup>.

Basidiomiceto (nombre [s] común [es])	Principio Activo o sustancia(s) a la que se le(s) atribuyen las propiedades	Actividad farmacológica comprobada
<i>Lentinus lepideus</i>	***	Antioxidante, antimicrobiano, inmunomodulador, citotóxico, antidiabético.
<i>Lentinus lepideus</i>	PG101.	Único compuesto aislado con actividad comprobada: recupera el daño en médula ósea debido a radiación.
<i>Agaricus brasiliensis</i>	$\beta$ -glucanos y oligosacáridos.	Antihiperglucemiante, antihipertriglicerolemiante, antihipercolesterolemiante.
<i>Auricularia auricula-judae</i> (oreja de Judas)	Polisacárido (FA) soluble en agua.	Hipoglucemiante, ligeramente antipirético. Coadyuvante en tratamiento de resfriados.

<b><i>Collybia confluens</i></b>	Exo-polímero (CCE)	Antidiabético.
<b><i>Coprinus Comatus</i></b>	Vanadio.	Antidiabético, hipocolesterolemiante e inmunomodulador.
<b><i>Cordyceps sinensis</i></b>	Polisacáridos CSP-1.	Hipoglucemiante al estimular la liberación de insulina pancreática.
<b><i>Ganoderma applanatum</i></b>	Exo-polímero (GAE).	Hipoglucemiante.
<b><i>Ganoderma Lucidum</i></b>	Cerebrósidos, polisacáridos (G1-PS).	Antidiabético, hipocolesterolemiante e inmunomodulador. Inhibe la ADN polimerasa de eucariotas.
<b><i>Grifola frondosa</i> (maitake)</b>	Fracción-D, MT- $\alpha$ -glucano, grifolan, N-acetilgalactosamina.	Antidiabético, hipocolesterolemiante, antitumoral e inmunomodulador.
<b><i>Hericium erinaceus</i></b>	Biomasa seca.	Hipoglucemiante, antioxidante, antilipoperoxidativo.
<b><i>Inonotus obliquus</i> (chaga)</b>	Befungin.	Antihiperoglucemiante, antilipoperoxidativo, antioxidante.
<b><i>Lentinus edodes</i> (shiitake)</b>	Lentinan, lentionina, galactoglucomanano, derivado disulfuro.	Antidiabético, antifúngico, antitumoral, antimicrobiano.
<b><i>Morchella esculenta</i></b>	Polisacárido galactomanano.	Inmunomodulador.
<b><i>Poria cocos</i> (o <i>Wolfiporia extensa</i>)</b>	Ácidos: dehidrotumulósico, dehidrotrametenólico, paquímico.	Antidiabético, anticancerígeno.
<b><i>Tremella fuciformis</i></b>	Glucuronoxilomanano, exopolisacáridos.	Hipoglucemiante.

\*\*\* = No se ha reportado, PG = peptidoglucano, G1-PS = *Ganoderma* 1-polisacárido, MT- $\alpha$ -glucano = maitake- $\alpha$ -glucano, GAE = *Ganoderma applanatum* exopolímero, FA = fracción acuosa, CCE= *Collybia confluens* exopolímero, CSP-1= *Cordyceps sinensis* polisacárido-1.

### **1.3 Antecedentes.**

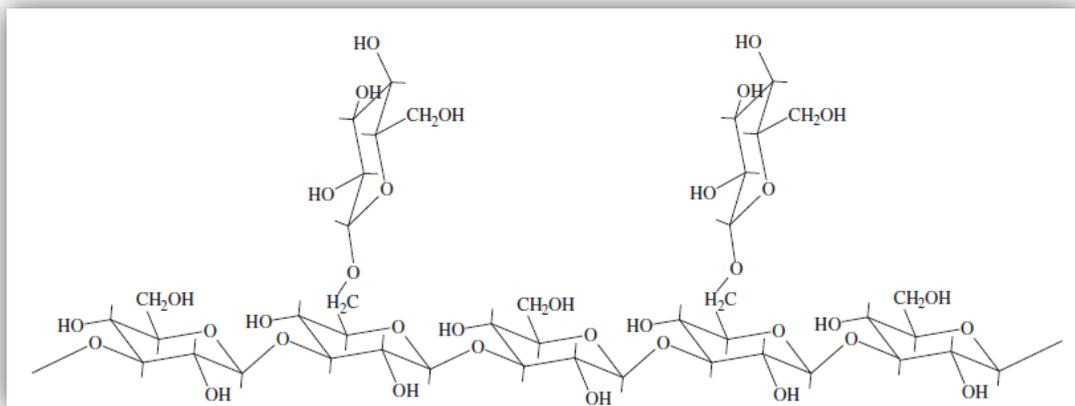
Se tiene conocimiento de que en la medicina oriental se utilizan gran variedad de hongos por su eficaz actividad farmacológica. La mayor cantidad de información científica acerca de macromicetos a nivel mundial proviene de países orientales como Rusia, China y Japón, mientras que en países occidentales los estudios se han realizado principalmente en Alemania y Estados Unidos. A estos macromicetos se les han denominado “modificadores de la respuesta biológica (MBR)” o inmunopotenciadores, al tener constituyentes derivados de componentes celulares y de metabolitos secundarios, que muestran una influencia positiva considerable sobre el sistema inmune, debido a que parecen incrementar su respuesta ante distintas enfermedades relacionadas con este sistema, como el cáncer y otros desórdenes autoinmunes, en los que se emplea un tratamiento farmacológico prolongado que regularmente disminuye las defensas naturales del cuerpo <sup>21, 23, 25, 32</sup>.

Hoy en día, se han realizado estudios donde los extractos acuosos y éter-etanolícos de hongos aislados que contienen glicoproteínas de gran peso molecular muestran actividad antidiabética. Algunos de los mecanismos comprobados son que los polisacáridos reducen los niveles de producción de

óxido nítrico y los niveles de expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células RINm5F de manera dosis-dependiente y que al inhibir la producción de esta enzima, se reducen los niveles de glucosa en ratas diabetizadas por estreptozotocina (STZ), como es el caso de *Agrocybe chanxingu* en el estudio llevado a cabo por Lee y colaboradores en el 2010 <sup>65</sup>.

En distintas especies de *Tremella*, por ejemplo *Tremella fuciformis*, se conoce que el efecto antihiper glucemiante en ratas diabetizadas proviene del polisacárido ácido que contiene manosa, xilosa, ácido glucurónico, glucosa y grupos o-acetilados, aislado del extracto acuoso del cuerpo fructífero, según lo reportado por Kiho, T. y cols., en 1995. En el mismo estudio, este grupo de investigación trabajó con ratas de glucemia normal y diabetizadas, y comprobaron su efectividad en la reducción de la glucosa plasmática. En este trabajo en el que se utilizaron ratones previamente diabetizados con STZ, la administración del compuesto fue intraperitoneal. La disminución de la glucosa en sangre se relacionó con el incremento de la actividad de la glucoquinasa, hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y el contenido de glucógeno en el hígado. Tanto las glucoquinasas como las hexoquinasas contribuyen a la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato, que participa en la gluconeogénesis; mientras que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es requerida para mantener los niveles de glutatión reducido como una protección al estrés oxidativo. Hasta este momento no se sabe la identidad de los compuestos responsables de la actividad antidiabética del basidiomiceto <sup>58, 59</sup>.

De *Lentinus edodes* (conocido como shiitake en Japón o xiang gu en China), se ha estudiado que sus principales polisacáridos, el lentinan, un  $\beta$ -glucano con cadena repetitiva (ver Figura 2), y el LEM (una proteína heteroglucano, denominada así por ser el extracto del micelio de *Lentinus edodes*), tienen propiedades terapéuticas para el tratamiento de hipertensión e hipercolesterolemia; además de incrementar la función del sistema inmunológico para atacar a células cancerosas, sirviendo como coadyuvantes en procesos de quimioterapia para el tratamiento de algunos tipos de cánceres. Otros de los constituyentes de *L. edodes* son eritadenina, ergosterol y algunas fracciones de ARN que tienen facultades hipocolesteremiantes, provitamina D-2 y antivirales, respectivamente <sup>34, 35, 36</sup>.



**Figura 2.** Cadena repetitiva del lentinan. Tomada de Y. Zhang *et al.* 2011 <sup>24</sup>.

En el 2006, Garza O. y colaboradores examinaron las actividades de citotoxicidad selectiva, antioxidación e inmunomodulación de los extractos acuosos de cuatro basidiomicetos: *Lentinus lepideus*, *Armillaria tabescens*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, y lograron comprobar que todos presentaban buena actividad antioxidante. El extracto acuoso de *L. lepideus* produjo el mayor aumento de la respuesta inmune en un estudio desarrollado sobre ratones BALB/c, en comparación con los otros tres macromicetos, a una dosis única de 20 mg/kg, al incrementar 84% el número de células formadoras de anticuerpos IgM en el bazo de los animales. Asimismo, en el estudio se comprobó que ninguno de los basidiomicetos tiene efecto citotóxico. En lo correspondiente al estudio de la actividad antioxidante, los extractos acuosos de las especies evaluadas disminuyeron la actividad oxidativa de la xantina oxidasa, que tuvo la función de control positivo, a una dosis de 2 mg/mL <sup>37</sup>.

Ahora se sabe que algunos extractos y compuestos aislados a partir de basidiomicetos muestran actividad antidiabética; Kamal y Li (2011) realizaron una vasta recopilación de macromicetos que han demostrado poseer este efecto y la parte del basidiomiceto y/o los compuestos responsables de la misma, en caso de haber sido aislados (ver Tabla 2) <sup>28</sup>:

**Tabla 2** Basidiomicetos recopilados por Kamal y Li (2011) <sup>28</sup>.

<b>Basidiomiceto</b>	<b>Parte del basidiomiceto y/o compuesto responsable de la actividad farmacológica</b>
<i>Agaricus campestris</i>	Biomasa.
<i>Agaricus subrufescens</i>	Cuerpos fructíferos, beta-glucanos, oligosacáridos.
<i>Agrocybe aegerita</i>	Glucanos y heteroglicanos aislados de extractos de agua caliente de los cuerpos fructíferos.
<i>Coprinus comatus</i>	Cuerpo fructífero.
<i>Cordyceps sinensis</i>	Polisacáridos crudos, polisacárido CSP-1.
<i>Ganoderma applanatum</i>	Polisacáridos solubles en agua de los cuerpos fructíferos.
<i>Ganoderma lucidum</i>	Polisacáridos.
<i>Grifola frondosa</i>	MT- $\alpha$ -glucano.
<i>Hericium erinaceus</i>	Extracto metanólico seco.
<i>Inonotus obliquus</i>	Materia seca del cultivo del basidiomiceto.
<i>Tremella fuciformis</i>	Glucuronoxilomanano, exopolisacáridos.
<i>Wolfiporia extensa</i>	Extracto crudo, triterpenos, ácido dehidrotumulósico, ácido dehidrotrametenólico y ácido paquímico.

Zhang y colaboradores evaluaron la antihiperlipidemia, la modulación de los lípidos y los efectos antioxidantes del extracto etanólico de la biomasa seca y del medio donde creció el micelio de *Coriolus versicolor*, usando ratones macho *ICR*, STZ como inductor de diabetes y glibenclamida como fármaco antidiabético. En el estudio demostraron que, a distintas dosis, el extracto mostraba efectos antioxidantes, antihiperlipidémicos e hipolipidémicos. También, en una examinación histológica posterior se apreció que el extracto redujo visiblemente los daños producidos en el páncreas por parte de la STZ. En el estudio se

trabajaron cinco grupos: los controles normal y diabético, y los grupos a los que se les administró diariamente la glibenclamida y el extracto etanólico de *C. versicolor*. Al grupo de glibenclamida se le administró 25 mg/kg del peso del ratón y a los grupos del extracto, 100 y 200 mg/kg, respectivamente. Las variaciones de glucosa de las 0, 3 y 5 semanas se muestran en la Tabla 3 <sup>24</sup>:

**Tabla 3** Variaciones de glucosa plasmática en los grupos controles, de glibenclamida y de medio de cultivo de *Coriulus versicolor* administrado en ratones *ICR* <sup>24</sup>.

<b>Grupo</b>	<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Semana 0 (mmol/L)</b>	<b>Semana 3 (mmol/L)</b>	<b>Semana 5 (mmol/L)</b>
<b>Control normal</b>	---	7.6	7.8	8.2
<b>Control diabético</b>	---	23.2	26.6	28.9
<b>Glibenclamida</b>	25	24.8	21.6	19.4
<b>Medio de cultivo de <i>C. versicolor</i></b>	100	23.9	22.9	20.2
<b>Medio de cultivo de <i>C. versicolor</i></b>	200	20.3	18.41	18.0

En un estudio realizado por Yang y colaboradores en el año 2008, se trabajó el efecto hipoglucemiante de exobiopolímeros de cinco hongos medicinales, todos basidiomicetos: *Coriolus versicolor*, *Cordyceps sinensis*, *Paecilomyces japonica*, *Armillaria mellea* y *Fomes fomentarius*. Los animales utilizados fueron ratas macho *Sprague-Dawley* diabetizadas con STZ. El macromiceto que obtuvo la mayor actividad hipoglucemiante fue *C. versicolor*, seguido de *P. japonica*, *C. sinensis*, *F.*

*fomentarius* y *A. mellea*, con porcentajes de reducción de glucosa de 29.9%, 21.4%, 21.2%, 21.2% y 12.3%, respectivamente, comparados con el control, NaCl al 0.9%. También se evaluó el nivel de triglicéridos en las ratas, donde *C. sinensis* ocupó ahora el primer lugar al conseguir un valor de  $40.57 \pm 1.72$  mg/dL; mientras que el control tuvo un valor de  $51.70 \pm 9.72$  mg/dL. En este estudio, la dosis de cada exobiopolímero fue de 100 mg/kg de peso de las ratas <sup>38</sup>.

En el año 2003, Jin y su equipo de trabajo investigaron a PG-101, un extracto soluble en agua de *L. lepideus*, que fue pulverizado y se disolvió en *buffer* de fosfatos para administrarlo por 24 días y de forma oral a ratones *BALB/c* hembras. Los resultados sugirieron que es un modificador efectivo de la respuesta biológica de la médula ósea; además, se demostró que los ratones que fueron irradiados en el estudio recuperaron más rápidamente células granulocíticas formadoras de colonias. La administración diaria del extracto aumentó el número de unidades formadoras de colonias a una cantidad cercana a la normal. También incrementó los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y GM-CSF al final de los días de la administración, resultando en una regulación de la producción de las citoquinas en el daño por radiación. Todo esto, demuestra que el PG-101 es un fuerte inmunomodulador que ayuda de manera importante en la recuperación del daño que causa la radiación en la médula ósea. Es importante señalar que, durante el estudio, ningún animal murió después de que se les administró 0.5 g/kg de peso corporal de PG-101 por 24 días, concluyendo con esto que a esta dosis el compuesto no es letal

De *Lentinus lepideus*, aunque ya se tiene conocimiento de que posee propiedades antidiabéticas de acuerdo con lo encontrado por Tamez de la O y cols. en el año 2013, aún no se ha logrado elucidar la estructura de la(s) sustancia(s) activa(s) responsable(s) de tal actividad ni su mecanismo de acción. En dicho trabajo, *L. lepideus* fue examinado junto a *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*: se les evaluaron los efectos hipoglucemiante e hipocolesterolemiante, utilizando como controles positivos glibenclamida y lovastatina, respectivamente, en ratas macho *Wistar* de 80 a 120 g de peso corporal, diabetizadas previamente con aloxana. Como control negativo se utilizó solución salina. A toda la biomasa proveniente de los basidiomicetos se le realizó una extracción metanólica inicial, se continuó con una extracción acuosa y finalmente se recuperaron las fracciones de oxalato de amonio y de hidróxido de sodio. El extracto metanólico fue designado como E1, el acuoso como E2 y de este último, se realizaron extracciones con oxalato de amonio denominadas E3. De E2 y E3 se recuperaron las fracciones FI y FII, respectivamente, luego de una maceración con etanol. Las evaluaciones realizadas de los tres basidiomicetos con respecto a la medición de glucosa en ratas a los tiempos de 3 y 6 horas, mostraron que el Exto MeOH logró una reducción en la glucosa plasmática significativamente superior al control positivo y a los demás basidiomicetos, con valores de 30% y 35% en los tiempos de 3 y 6 horas, respectivamente. El efecto hipocolesterolemiante del mismo Exto MeOH fue casi nulo <sup>40</sup>.

Jung y colaboradores (2008) trabajaron con el extracto acuoso obtenido a partir del micelio de *L. lepidus*, de donde obtuvieron dos fracciones denominadas I y II, que fueron posteriormente administradas a ratones BABL/c. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 4 <sup>41</sup>:

**Tabla 4** Actividades de las fracciones acuosas I y II de *L. lepidus* obtenidos por Jung y colaboradores (2008) <sup>41</sup>.

<b>Actividad evaluada</b>	<b>Fracción I</b>	<b>Fracción II</b>
<b>Enzimas de macrófagos lisosomales</b>	Actividad moderada.	Mayor actividad que la FI y con valores superiores al control positivo.
<b>Producción de citoquinas</b>	A 50 µg/mL obtuvo su mayor actividad.  Induce aumento en citoquinas efectoras IL-1β, TNF-α e IL-6 en macrófagos.	A 100 µg/mL tuvo el máximo de efectividad. La producción de citoquinas fue dosis dependiente en esta fracción.  Induce aumento en citoquinas efectoras IL-1β, TNF-α e IL-6 en macrófagos.
<b>Proliferación de esplenocitos</b>  (Se usaron mitógenos de linfocitos con lipopolisacáridos como comparativo)	Se presentaron resultados similares a los mitógenos de referencia con dosis de 20 µg/mL.	Tuvo resultados parecidos al control positivo (lipopolisacáridos) a dosis mayores que la fracción I, a 50 y 100 µg/mL.  El aumento de proliferación de esplenocitos se presentó a 50 µg/mL.

Tabla 4 (Continúa)

<b>Proliferación de los linfocitos T y B</b>	Linfocitos T: aumento en forma dosis-dependiente, comparado con el control. Efecto de mitógeno.  Linfocitos B: se incrementó a todas las dosis. Ausencia de efecto de mitógeno.	Linfocitos T: la máxima proliferación se presentó a la dosis más baja.  Tuvo el efecto de mitógeno en los linfocitos T, pero no en los B.
<b>Citotoxicidades directas en células humanas de adenocarcinoma gástrico.</b>	Activa efectivamente a macrófagos, citoquinas en macrófagos y linfocitos T, pero no los B.	Similar a la fracción I.

Además, en el trabajo se realizó un análisis químico para ambas fracciones, de los azúcares totales por medio de cromatografía de gases con detector de ionización en flama, basado en el método de hidrólisis y acetilación de aminoácidos utilizando cromatografía en gel. A través de este análisis, determinaron a su vez que la actividad inmunomoduladora depende del peso molecular de los compuestos involucrados. En la fracción I hubo 84.9% de azúcares totales, repartidos en: fucosa (3.8%), ribosa (2.4%), xilosa (35.1%), manosa (47.7%), galactosa (1.0 %) y glucosa (9.7%); mientras que en la fracción II encontraron 69.8% de azúcares totales, divididos en: fucosa (4.9%), ribosa (1.7%), xilosa (1.0%), manosa (50.8%), galactosa (38.7%) y glucosa (2.6%)<sup>41</sup>.

Recientemente, Yoon y colaboradores (2011), trabajaron a su vez con *Lentinus lepideus* y evaluaron el efecto antihiperlipidémico de la fibra dietética obtenida de

los cuerpos fructíferos del basidiomiceto. La dosis fue de 5% de cuerpos fructíferos de *L. lepideus* y de 1% de colesterol, respecto al total del alimento administrado vía oral en la dieta de las ratas hembras *Sprague-Dowley* albinas; los cuerpos fructíferos fueron molidos y mezclados con el alimento. Los resultados mostraron una reducción de peso no significativa en las ratas (con menos del 10%, comparado con el peso inicial) y disminuyeron los niveles de lípidos y glucosa en el plasma, pero no hubo efecto en la reducción del daño en hígado ni en riñón ocasionado previamente por la alimentación alta en colesterol <sup>42</sup>.

### **1.3.1 Estreptozotocina (STZ)**

La STZ es un agente químico capaz de inducir diabetes a roedores que se utilizan para modelos biológicos. Otro ejemplo de agente diabetógeno comúnmente utilizado en este tipo de estudios es la aloxana y, al igual que la STZ, pertenece al grupo de las nitrosureas, cuyo mecanismo de acción se centra en la inducción de daño en el ADN por alquilación de los sitios específicos de sus bases, que resulta en la generación de radicales libres durante el metabolismo de estos agentes. El órgano blanco principal es el páncreas, aunque se presenta daño en otros órganos que participan en el metabolismo y eliminación de glucosa, como hígado y riñón.

La vía de administración más común es la intraperitoneal (IP) y el *buffer* de citrato de sodio 0.1 M, a pH 4.5, se emplea usualmente como vehículo. Las dosis

que se utilizan para STZ, varían de 40 a 60 ó hasta 150 mg/kg, siendo la idónea la de 50 mg/kg del peso del roedor. De manera general, la mayor actividad de la STZ se observa a las dos horas de la aplicación IP al presentarse una hiperglucemia marcada debido a que se empieza a acumular STZ en las células  $\beta$  del páncreas, ocasionando un decremento considerable de insulina en un proceso de restauración por parte del organismo. Horas después, se presenta una hipoglucemia importante debido a esta restauración, junto al aumento de los niveles de insulina. Finalmente, se llega a un agotamiento de insulina y trae consigo hiperglucemia. El daño en las células  $\beta$  del páncreas y el descenso de las concentraciones de insulina se demuestran en las distintas variaciones de los niveles de glucosa plasmática en los modelos realizados. La STZ evita inicialmente la respuesta de las células  $\beta$  a la glucosa, luego la respuesta se presenta temporalmente hasta que se produce una pérdida permanente de la función, debido a que las células quedan dañadas<sup>38, 43, 44, 45, 46, 47</sup>.

En un estudio realizado en ratas hembras *Wistar*, se evaluó la administración de STZ a distintas dosis, 33, 50 y 75 mg/kg del peso de la rata y se utilizó como control el vehículo solo (a 0.5 mL/100 g del peso de la rata). A todos los animales se les hizo un seguimiento de variación de glucosa y peso por 20 días. El grupo de ratas a las que se les administró 75 mg/kg de peso de la rata, perecieron antes de llegar al día cinco de la evaluación. Al grupo que tuvo la administración del control, tuvo la tendencia a aumentar de peso y a mantener los valores de glucosa normal. El grupo al que se le administró STZ a la dosis de 33 mg/kg presentó una

disminución en los niveles de glucosa plasmática, con valores menores a 200 mg/dL después del quinto día, y menos del 50% de la población desarrolló diabetes; mientras que el que recibió la dosis de 50 mg/kg mantuvo los valores a más de 300 mg/kg y con tendencia a la estabilización después del segundo día de administrada la STZ. Al final del trabajo, concluyeron que la dosis de 50 mg/kg produce una diabetes más estable en las ratas, permanente por lo menos durante 20 días después de la administración de una dosis única de STZ vía IP <sup>43</sup>.

Otros estudios al respecto han reflejado que la dosis de 50 mg/kg de STZ es la mejor para establecer un modelo animal de diabetes. Por ejemplo, Aseervatham y colaboradores utilizaron esta dosis en su trabajo de evaluación del efecto de *Semecarpus anacardium* en el metabolismo de carbohidratos y la producción de energía en ratas diabéticas. En el año 2006, Byung-Keun *et al* en su trabajo sobre el efecto antidiabético e hipolipidémico de *Collybia confluens* utilizaron esta misma dosis experimental de STZ con buenos resultados; además, repitieron el mismo modelo en el año 2008, pero ahora en la evaluación del efecto hipoglucémico de los exobiopolímeros de cinco diferentes basidiomicetos. Por otro lado, Hwang y su equipo de trabajo probaron el efecto antidiabético de los exobiopolisacáridos producidos por *Phellinus baumii* sobre ratas diabéticas inducidas por STZ a esta misma dosis de 50 mg/kg <sup>38, 44, 62</sup>.

#### **1.4. Justificación**

La importancia de la diabetes, radica en la pérdida humana y millonaria que se genera debido a las complicaciones que se presentan. Por esta causa, ha sido de gran relevancia la búsqueda de alternativas viables y costeables que ayuden a tratar este padecimiento, por lo que se ha recurrido a la medicina tradicional para obtener nuevos compuestos de los que se puedan obtener más ventajas durante su administración comparados con los que actualmente existen en el mercado.

#### **1.5 Hipótesis**

Los compuestos aislados a partir de *Lentinus lepideus* reducirán los niveles de glucosa plasmática en un modelo animal de diabetes en igual o mayor proporción que el fármaco glibenclamida.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo general.**

Aislar y caracterizar compuestos con actividad antidiabética obtenidos a partir del extracto metanólico obtenido de *Lentinus lepideus*.

### **1.6.2 Objetivos específicos.**

- 1.- Cultivar el basidiomiceto en fase sólida.
- 2.- Cultivar el basidiomiceto en fase líquida *in vitro* a partir de lo cultivado en la fase sólida.
- 3.- Obtener el extracto metanólico a partir de la biomasa del basidiomiceto para el fraccionamiento posterior.
- 4.- Inducir hiperglucemia en ratas normoglucémicas para establecer un modelo animal de diabetes.
- 5.- Aislar y caracterizar el(los) compuesto(s) más activo(s) del extracto metanólico de *Lentinus lepideus*.
- 6.- Evaluar la actividad de reducción de la glucosa plasmática del (los) compuesto(s) aislado(s), en el modelo animal previamente establecido.
- 7.- Evaluar la actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en el (los) compuesto(s) más activo(s) del extracto metanólico de *Lentinus lepideus*.

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Material

##### 2.1.1 Material biológico.

###### 2.1.1.1 *Material fúngico.*

El basidiomiceto evaluado en el presente trabajo fue proporcionado por el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL. Los carpóforos frescos de *Lentinus lepideus* fueron recolectados previamente en los bosques templados de coníferas y encinos del municipio de Galeana, N.L. en el año 2011; su clasificación taxonómica, registro y respectivo aislamiento, se llevó a cabo en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL, campus Linares.

### **2.1.1.2 Animales.**

Se utilizaron ratas macho *Wistar*, de 180 a 220 g de peso y de entre 7 a 10 semanas de edad, que fueron obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de laboratorio, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de 25 °C y tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*, mientras se encontraban en jaulas de acrílico con tapa de rejilla metálica.

### **2.1.2. Material y equipo.**

Abatelenguas de plástico.

Agitadores magnéticos.

Autoclave Market Forge Sterilmatic, modelo MEA 109-85.

Balanza analítica Scout 600 g, modelo SP-601.

Balanza analítica AND, modelo HR-200.

Baño de ultrasonido Branson, modelo 2510 R-MTN.

Baño recirculador de agua Brookfield, modelo TC-502.

Bomba de vacío Felisa, Modelo FE-1405.

Cajas de Petri desechables de 100 x 15 mm.

Campana de flujo laminar, Labconco.

Cortador.

Embudo de separación de 250 mL, Pyrex.

Embudo de filtración de plástico.

Equipo para resonancia magnética nuclear Varin Unity Inova.

Glucómetro Accucheck Active.

Hojas de bisturí.

Matraces Erlen-Meyer de fondo plano de 250 ml, Pyrex.

Matraz para rotaevaporador, IKA.

pH-metro Corning, modelo 430.

pH-metro Beckman, modelo 50.

Pipetas serológicas de 1, 2 y 5 mL, Pyrex.

Pipetas Pasteur, Pyrex.

Pinzas para soporte universal.

Placa de calentamiento con agitador magnético, Thermoline Cientific.

Porta bisturíes.

Probetas de vidrio de 50, 100 y 500 mL, Pyrex.

Regla metálica, 30 cm.

Rotaevaporador IKA, RV10 digital con baño de agua IKA HB10 digital.

Sonda orogástrica.

Soporte universal.

Vasos de precipitado de distintas capacidades, Pyrex.

### 2.1.3 Reactivos.

#### **2.1.3.1 Reactivos para la preparación del medio de cultivo *Melin-Norkrans modificado.***

Agar	DIFCO
Agua bidestilada	
Cloruro de calcio	Merck
Cloruro férrico	Sigma
Cloruro de sodio	Sigma
D-(+)-glucosa	Sigma
Extracto de malta	Bioxon
Extracto de levadura	Bioxon
Fosfato de amonio	Merck
Fosfato de potasio monobásico	Sigma
Hidrocloruro de tiamina	Sigma
Sulfato de magnesio heptahidratado	PQM
Ácido cítrico monohidratado	PQM
Fosfato de sodio dibásico	Baker

**2.1.3.2 Reactivos para el fraccionamiento del Exto MeOH de *L. lepidus*.**

Acetato de etilo	J. T. Baker
Cloroformo	J. T. Baker
Cloruro de metileno (Diclorometano)	J. T. Baker
Hexano	J. T. Baker
Metanol	J. T. Baker
Placas de sílica con aluminio para Cromatografía en Capa Fina (CCF)	Fluka Analytical. Sigma-Aldrich
Sílica gel, grado 10180, 70-230 mesh, 40Å	Aldrich

**2.1.3.3 Reactivos para la medición de glucosa en ratas.**

Tirillas reactivas Accu-Chek Active.

## **2.2 MÉTODOS.**

### **2.2.1 Cultivo *in vitro* de macromicetos.**

#### ***2.2.1.1 Cultivo del basidiomiceto en medio sólido.***

El cultivo de *L. lepideus* se realizó en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la UANL. La biomasa del macromiceto se obtuvo a partir de cepas puras, previamente aisladas, de las cuales se tomó el micelio y se colocó en cajas Petri con medio Melin-Norkrans modificado (pH: 6.5) solidificado con agar bacteriológico, cuya composición se encuentra descrita en la Tabla 5. Las cajas Petri una vez sembradas, se sellaron con parafilm y se dejaron incubar durante tres a cuatro semanas a temperatura de 25 a 30°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

**Tabla 5** Composición del medio de cultivo Melin Norkrans modificado.

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	0.50
Extracto de malta	3.0
D – glucosa	10.0
(NH) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.15
CaCl	0.05
FeCl <sub>3</sub>	1.2
NaCl	0.025
Tiamina	100.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 mL

Se procedió a la inoculación en medio Melin-Norkrans modificado y su cultivo durante ocho semanas más, a partir de los cultivos incubados previamente en sólido.

#### **2.2.1.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido.**

Se tomaron inóculos de *L. lepidus* a partir de la biomasa obtenida de las cajas petri sembradas previamente. Los inóculos, en forma de cuadros de 1x1 cm, se

colocaron en matraces Erlen-Meyer de 250 mL, que contenían 150 mL de medio Melin-Norkrans modificado, a pH 6.5. Los matraces se dejaron incubar por dos meses, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y a temperatura de 25 a 30°C.

### **2.2.1.3 Obtención de la biomasa de *L. lepidus*.**

La biomasa fue separada del medio líquido por filtración y se dejó secar a temperatura ambiente durante tres a cinco días. Posteriormente, se etiquetó y almacenó a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

## **2.2.2 Fraccionamiento del Exto MeOH de *L. lepidus*.**

### **2.2.2.1 Obtención del Exto MeOH.**

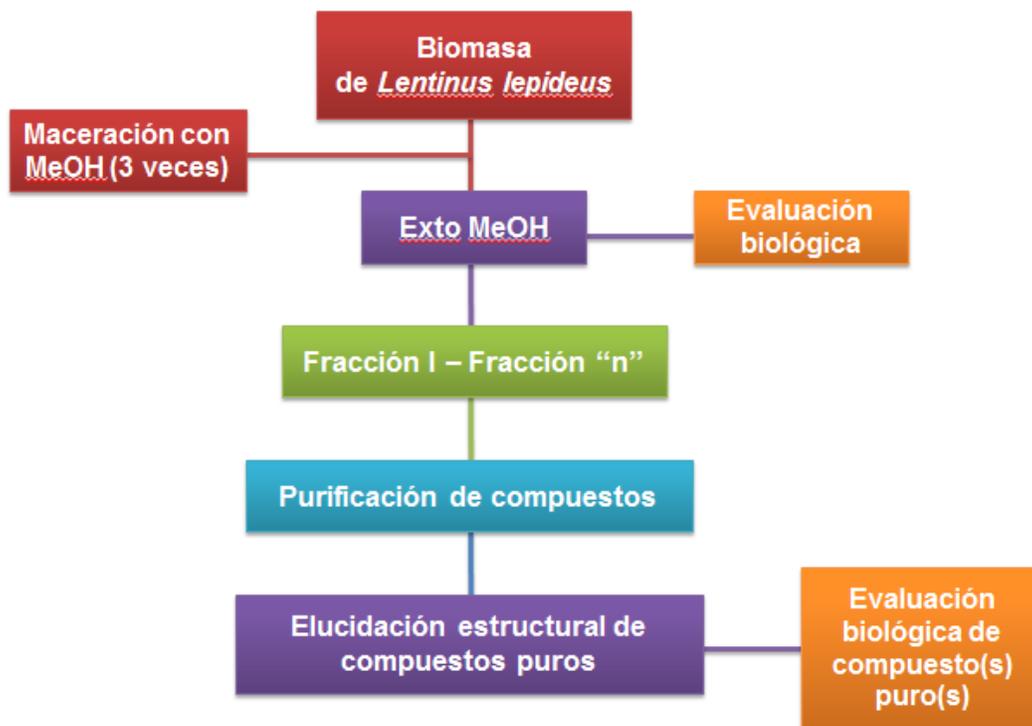
La biomasa seca obtenida se sometió a maceración con metanol, tres veces; la primera durante 24 horas, la segunda y tercera por cuatro horas cada una, para recuperar así el Exto MeOH deseado. Por cada gramo de biomasa seca se adicionaron 30 mL de metanol puro, cada vez. El Exto MeOH se llevó a sequedad mediante el uso de un evaporador rotativo, se transfirió a un vial para secarlo a vacío y se almacenó hasta su evaluación posterior.

### 2.2.2.2 Subfraccionamiento del Exto MeOH.

Se realizaron pruebas con el Exto MeOH a distintas concentraciones y combinaciones de solventes en cromatografía en capa fina (CCF), hasta obtener la combinación más adecuada para utilizar durante la separación por cromatografía en columna en fase reversa.

El fraccionamiento del Exto MeOH de *L. lepideus* fue realizado por CC en columna de vidrio (60 cm de largo x 7 cm de diámetro). La fase estacionaria fue sílica gel (70-230 mesh) y en la fase móvil se utilizaron Hex 100%, Hex:AcOEt en gradiente, AcOEt 100%, AcOEt:MeOH en gradiente y MeOH 100%.

En la Figura 3 se muestra la metodología general utilizada para llegar a los compuestos puros obtenidos a partir de la biomasa de *L. lepideus*. Esta se macera con MeOH y se recupera el Exto MeOH resultante, que se evaluó biológicamente. Además, el Exto MeOH se sometió a fraccionamiento en CC, se purificaron los compuestos seleccionados por medio de distintas técnicas cromatográficas (como cromatografía en placa preparativa, reacciones de acetilación, secado lento con solventes, entre otras), se realizó la caracterización por medio de análisis por RMN y se seleccionó el compuesto que, según la estructura y bajo análisis bibliográfico, mostró mayor potencial como agente antidiabético para ser evaluado finalmente, de forma biológica.



**Figura 3.** Procedimiento general de trabajo para la obtención, purificación y evaluación de los compuestos obtenidos del Exto MeOH de *L. lepideus*.

## 2.2.3 Evaluación de la actividad biológica de *L. lepideus*.

### 2.2.3.1 Establecimiento del modelo de diabetización animal.

Para establecer el modelo, se utilizaron cinco ratas macho *Wistar* con peso mayor a 200 g para ser diabetizadas con STZ, que fue inyectada por vía IP a una dosis de 50 mg/kg del peso de la rata. La STZ fue disuelta en *buffer* de citrato de sodio, a pH 4.5. Se midió la glucosa a los tiempos: 0, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 144 y 216 horas, por medio de un glucómetro Accu-chek Active®, mediante la obtención de sangre por punción con lanceta en el extremo distal de la cola de las ratas. El modelo fue realizado por duplicado.

Se realizaron el modelo de diabetización y la réplica en ratas macho *Wistar* con niveles de glucemia normal. A ambos grupos de ratas se les clasificó por subgrupos y se les numeró; posteriormente se realizó la medición de glucosa y se determinó el peso un día antes del inicio del ensayo y en los días 1, 2, 3, 6 y 9. Los pesos obtenidos se muestran en la Tabla 6, con los cuales se realizó el cálculo para obtener la dosis correspondiente para cada animal:

**Tabla 6.** Peso, cantidad de STZ y volumen de solución de trabajo administrado a ratas macho *Wistar* del modelo de diabetización en animales.

<b>Rata</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>STZ (mg)</b>	<b>Volumen de solución de trabajo (mL)</b>
<b>1</b>	272	13.60	0.68
<b>2</b>	303	15.15	0.75
<b>3</b>	291	14.55	0.72
<b>4</b>	274	13.70	0.68
<b>5</b>	339	16.45	0.84

La solución de trabajo administrada se preparó a una concentración de 20 mg/mL de STZ, para administrar el menor volumen de solución posible con el objetivo de minimizar problemas a los animales durante este paso.

### 2.2.3.2 Réplica del modelo animal de diabetes

La réplica se llevó a cabo de manera similar que el modelo y para este caso, los pesos y las dosis respectivas de STZ se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Peso, cantidad de STZ y volumen de solución de trabajo administrado a ratas macho *Wistar* de la réplica del modelo de diabetización en animales.

Rata	Peso (g)	STZ (mg)	Volumen de solución de trabajo (mL)
1	383	19.15	0.95
2	273	13.65	0.68
3	243	12.15	0.60
4	318	15.90	0.79
5	368	18.40	0.92

### 2.2.4 Evaluación de la actividad moduladora de los niveles glucémicos en ratas. Evaluación del Exto MeOH.

Para evaluar el Exto MeOH, este fue disuelto en *buffer* de citrato de sodio a pH 4.5, para obtener soluciones de concentraciones conocidas que permitieran la administración del mismo a dosis de 30, 100 y 300 mg/kg del peso de la rata a tres grupos distintos, respectivamente; a su vez, a los otros dos grupos de ratas se les administró glibenclamida y vehículo, Tween 80, a dosis de 10 mg/kg de peso a cada uno. Estas dos últimas también se prepararon en *buffer* de citrato de sodio. Todas las administraciones fueron realizadas con la ayuda de una sonda por vía orogástrica.

Además, para la evaluación, las ratas fueron divididas en dos grupos iniciales, las que serían utilizadas para diabetizar y las normoglucémicas, para lo cual fue manipulado un tamaño de muestra de cinco y cuatro ratas, respectivamente.

#### **2.2.4.1 Evaluación del Exto MeOH en ratas normoglucémicas diabetizadas con STZ.**

Cada grupo de 25 ratas previamente diabetizadas como se describió en el punto 2.2.3.1 fue dividido en cinco subgrupos. Cada subgrupo estuvo formado por una población de cinco ratas.

La diabetización de este grupo de ratas se realizó con base en el modelo de diabetización previamente descrito en el punto 2.2.3.1. La evaluación del Exto MeOH se inició el día en que quedó establecida la diabetes y fue segura la irreversibilidad de la misma.

Para realizar el ensayo, las ratas fueron divididas, marcadas, numeradas y pesadas durante la diabetización; las soluciones del vehículo, la glibenclamida y las distintas concentraciones de Exto MeOH a evaluar se elaboraron en el *buffer* de citratos, pH 4.5, justo antes de su administración. Los grupos formados y las dosis a evaluar se enlistan a continuación:

- Grupo I: vehículo Tween 80, 10 mg/kg de peso de la rata.
- Grupo II: Exto MeOH, 30 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo III: Exto MeOH, 100 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo IV: Exto MeOH, 300 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo V: glibenclamida, 10 mg/kg del peso de la rata.

La administración de la dosis del vehículo, la glibenclamida y de las distintas dosis de Exto MeOH en los grupos respectivos, se realizó durante siete días y los niveles de glucosa plasmática se evaluaron a los tiempos: 0, 3 y 6 horas consecutivas, luego de la dosis diaria. Además, se monitoreó la variación del peso de cada rata.

En todo momento, los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio en el bioterio, en jaulas de acrílico y reja de metal, donde tuvieron una temperatura de 25°C, con acceso libre al agua y alimento.

A continuación, se muestra la organización final del experimento, la cantidad de STZ conforme al peso y el volumen final administrado a cada rata de la solución estándar de STZ disuelta en el *buffer* (ver Tabla 8). Cada solución de trabajo, se hizo a una concentración de 20 mg del compuesto (STZ, tween, glibenclamida o Exto MeOH) / mL de *buffer*.

**Tabla 8** Dosis de STZ administrada a ratas normoglucémicas durante la evaluación del Exto MeOH de *L. lepideus*.

Grupo / Rata	Peso inicial (g)	STZ ( mg)	Volumen de solución de trabajo de STZ (mL)
<b>Exto MeOH (300mg/kg)</b>			
1	291	14.55	0.72
2	280	14	0.70
3	224	11.2	0.56
4	178	8.9	0.44
5	152	7.6	0.38
<b>Exto MeOH (100 mg/kg)</b>			
1	215	10.75	0.53
2	265	13.25	0.66
3	174	8.7	0.43
4	263	13.15	0.65
5	281	14.05	0.70
<b>Exto MeOH (30 mg/kg)</b>			
1	245	12.2	0.61
2	286	14.3	0.71
3	218	10.9	0.54
4	250	12.5	0.62
5	238	11.9	0.59
<b>Glibenclamida (10 mg/kg)</b>			
1	157	7.8	0.39
2	180	9.0	0.45
3	182	9.1	0.45
4	208	10.4	0.52
5	170	8.5	0.45
<b>Tween (10 mg/kg)</b>			
1	244	12.2	0.61
2	242	12.1	0.60
3	228	11.4	0.57
4	253	12.6	0.63
5	243	12.1	0.60

En la Tabla 9 se exponen las dosis respectivas de vehículo, glibenclamida o Exto MeOH para cada rata:

**Tabla 9** Dosis de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis de Exto MeOH de *L. lepidus* administradas a ratas diabetizadas.

Grupo / Rata	Peso inicial (g)	Dosis a administrar (mg)	Volumen de solución de trabajo (mL)
<b>Exto MeOH (300 mg/kg) ***</b>			
1	217	65.10	3.25
2	214	64.20	3.21
3	173	51.90	2.59
4	205	61.50	3.07
<b>Exto MeOH (100 mg/kg)</b>			
1	160	16.00	0.80
2	206	20.60	1.03
3	254	25.40	1.27
4	261	26.10	1.30
5	233	23.30	1.65
<b>Exto MeOH (30 mg/kg)</b>			
1	189	5.67	0.28
2	215	6.45	0.32
3	178	5.34	0.26
4	187	5.61	0.28
5	169	5.07	0.25
<b>Glibenclamida (10 mg/kg) ***</b>			
1	196	1.96	0.098
2	162	1.62	0.081
3	203	2.03	0.101
5	162	1.62	0.081
<b>Tween 80 (10 mg/kg) ***</b>			
1	177	1.77	0.088
2	183	1.83	0.091
3	174	1.74	0.087
5	185	1.85	0.092

\*\*\* Estos grupos cuentan con una rata menos debido a que estas perecieron durante el proceso de diabetización.

### 2.2.4.2 Evaluación del Exto MeOH en ratas normoglucémicas.

La evaluación del Exto MeOH también fue realizada en ratas macho *Wistar* de glucemia normal; esta se llevó a cabo de forma similar a lo explicado en el punto 2.2.4.1, pero sin el pretratamiento de diabetización; en esta ocasión, la población de cada subgrupo de animales fue de cuatro miembros. Las administraciones de los controles positivo y negativo, además del extracto a distintas dosis según el grupo, se realizaron como se exponen a continuación (ver Tabla 10):

**Tabla 10.** Dosis de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis de Exto MeOH de *L. lepideus* administradas a ratas normoglucémicas.

Grupo / Rata	Peso inicial (g)	Dosis a administrar (mg)	Volumen de dosis de solución de trabajo (mL)
<b>Exto MeOH (300 mg/kg)</b>			
1	196	58.8	2.94
2	191	57.3	2.86
3	164	49.2	2.46
4	159	47.7	2.38
<b>Exto MeOH 100 mg/kg)</b>			
1	150	15.0	0.75
2	189	18.9	0.94
3	183	18.3	0.91
4	172	17.2	0.86
<b>Exto MeOH (30 mg/kg)</b>			
1	184	5.5	0.27
2	142	4.2	0.21
3	146	4.3	0.21
4	179	5.3	0.26

Tabla 10 (Continúa)

<b>Glibenclamida (10 mg/kg)</b>			
1	167	1.6	0.08
2	186	1.8	0.09
3	157	1.5	0.078
4	198	1.9	0.09
<b>Tween 80 (10 mg/kg)</b>			
1	154	1.5	0.07
2	193	1.9	0.09
3	138	1.3	0.06
4	171	1.7	0.08

## 2.2.5 Evaluación de la actividad biológica de compuesto(s) puro(s) obtenido(s) a partir del Exto MeOH de *L. lepideus*.

### 2.2.5.1 Evaluación de los compuestos puros en ratas diabetizadas con STZ.

La diabetización y posterior evaluación del compuesto puro se realizó de manera idéntica a la evaluación de Exto MeOH del basidiomiceto, con una “n” de cinco ratas por grupo (punto 2.2.4.1), incluyendo la diabetización de los animales y el monitoreo del peso el día previo y durante la evaluación. Para esta evaluación, se formaron los siguientes grupos (ver Tabla 11):

- Grupo I: compuesto AH-4, 31 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo II: compuesto AH-4, 10 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo III: compuesto AH-4, 3.1 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo IV: glibenclamida, 10 mg/kg del peso de la rata.
- Grupo V: vehículo Tween 80, 10 mg/kg de peso de la rata.

La evaluación se realizó durante cuatro días, en los cuales se midió la glucosa en plasma a los tiempos: 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas, justo después de la administración del compuesto. La concentración de la solución de trabajo fue de 20 mg / mL.

**Tabla 11** Dosis de STZ administrada a ratas normoglucémicas durante la evaluación del compuesto AH-4 del Exto MeOH de *L. lepideus*.

Grupo / Rata	Peso inicial (g)	STZ ( mg)	Volumen de solución de trabajo de STZ (mL)
<b>AH-4, 31 mg/kg</b>			
1	216	10.80	0.54
2	219	10.95	0.54
3	223	11.15	0.55
4	217	10.85	0.54
5	218	10.09	0.50
<b>AH-4, 10 mg/kg</b>			
1	217	10.85	0.54
2	191	9.55	0.47
3	194	9.70	0.48
4	206	10.30	0.51
5	207	10.35	0.51
<b>AH-4, 3.1 mg/kg</b>			
1	185	9.25	0.46
2	203	10.15	0.50
3	183	9.15	0.45
4	181	9.05	0.45
5	199	9.95	0.49
<b>Glibenclamida (10 mg/kg)</b>			
1	175	8.75	0.43
2	183	9.15	0.45
3	174	8.70	0.43
4	183	9.15	0.45
5	173	8.65	0.43

Tabla 11 (Continúa)

<b>Tween (10 mg/kg)</b>			
1	242	12.10	0.60
2	241	12.05	0.60
3	262	13.10	0.65
4	241	12.05	0.60
5	243	11.7	0.58

A continuación se muestran las dosis administradas del compuesto puro y de los controles en el día uno de la evaluación (ver Tabla 12). Las dosis siguientes se ajustaron según el peso del día previo.

**Tabla 12** Cantidades de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis del compuesto AH-4 obtenido a partir del Exto MeOH de *L. lepideus* administrada a ratas diabetizadas.

<b>Grupo / Rata</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Dosis a administrar (mg)</b>	<b>Volumen de solución de trabajo (mL)</b>
<b>AH-4, 31 mg/kg</b>			
1	216	6.70	0.334
2	214	6.63	0.331
3	220	6.82	0.341
4	220	6.82	0.341
5	215	6.67	0.333
<b>AH-4, 10 mg/kg</b>			
1	197	1.97	0.098
2	195	1.95	0.097
3	210	2.10	0.105
4	206	2.06	0.103
5	212	2.12	0.106
<b>AH-4, 3.1 mg/kg</b>			
1	191	0.59	0.029
2	191	0.59	0.029
3	187	0.58	0.028
4	188	0.58	0.029
5	192	0.60	0.029

Tabla 12 (Continúa)

<b>Glibenclamida (10 mg/kg)</b>			
1	176	1.76	0.088
2	171	1.71	0.085
3	176	1.76	0.085
4	176	1.76	0.088
5	160	1.60	0.080
<b>Tween (10 mg/kg)</b>			
1	220	2.20	0.110
2	227	2.27	0.113
3	246	2.46	0.123
4	234	2.34	0.117
5	221	2.21	0.110

Durante esta evaluación, no murió ningún animal, por lo que los datos se muestran con grupos completos.

#### **2.2.5.2 Evaluación del compuesto puro en ratas normoglucémicas.**

La evaluación se realizó en grupos con cuatro ratas por cada subgrupo y de manera similar a lo descrito en el punto 2.2.4.2 en la evaluación del Exto MeOH de *L. leptideus*. En la Tabla 13 se muestran las dosis del día uno de trabajo.

**Tabla 13** Cantidades de vehículo (Tween 80), glibenclamida y las distintas dosis del compuesto AH-4 obtenido a partir del Exto MeOH de *L. lepideus* administradas a ratas normoglucémicas.

<b>Grupo / Rata</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Dosis a administrar (mg)</b>	<b>Volumen de solución de trabajo (mL)</b>
<b>AH-4, 31 mg/kg</b>			
1	200	6.20	0.31
2	210	6.51	0.32
3	213	6.60	0.33
4	216	6.70	0.33
<b>AH-4, 10 mg/kg</b>			
1	192	1.92	0.09
2	188	1.88	0.09
3	204	2.04	0.10
4	203	2.03	0.10
<b>AH-4, 3.1 mg/kg</b>			
1	178	0.55	0.02
2	185	0.57	0.02
3	167	0.52	0.02
4	177	0.55	0.02
<b>Glibenclamida (10 mg/kg)</b>			
1	150	1.50	0.07
2	156	1.56	0.07
3	152	1.52	0.07
<b>Tween (10 mg/kg)</b>			
1	165	1.65	0.08
2	162	1.62	0.08
3	163	1.63	0.08

## **2.3 Elucidación del (los) compuesto(s) puro(s) obtenido(s) a partir del Exto MeOH de *L. lepideus*.**

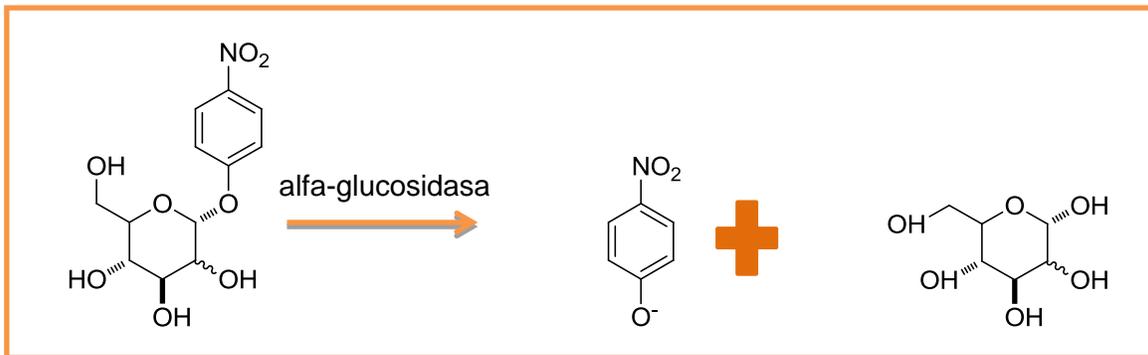
### **2.3.1 Elucidación estructural mediante el uso de resonancia magnética nuclear.**

Para este paso, se utilizaron las técnicas de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, por medio del aparato Varian Unity Inova a 300 MHz; además del apoyo de técnicas cromatográficas como cromatografía en placa fina y cromatografía en placa preparativa.

## **2.4 Ensayo enzimático del compuesto AH-4, obtenido de las fracciones F71-127.**

### **2.4.1 Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa.**

Esta técnica se basa en que el sustrato *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, por acción de la alfa-glucosidasa, hidroliza su enlace  $\alpha$ -1,6-glucosídico y se forma un complejo coloreado (Figura 4), que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una absorbancia de 405 nm.



**Figura 4** Hidrólisis de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido con  $\alpha$ -glucosidasa.

Se prepara una solución de  $\alpha$ -glucosidasa (25  $\mu$ L a 0-2 U/mL), se adiciona solución de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (25  $\mu$ L a 23.2 mM), las distintas concentraciones a evaluar 1, 10, 100  $\mu$ g/mL y un *buffer* de fosfatos 67 mM (175  $\mu$ L, pH = 6.8). La solución final de la reacción tiene un volumen de 250  $\mu$ L, que se guarda en incubación a 37°C por 15 minutos, para finalmente adicionar 50  $\mu$ L de solución de carbonato de sodio 1M, lo que detiene esta reacción. El control positivo es preparado con quercetina; mientras que el negativo con el mismo *buffer* de fosfatos. El porcentaje de inhibición enzimática es calculado como sigue (Figura 5):

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

**Figura 5** Cálculos del porcentaje de inhibición enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa (DO = dispersión óptica).

## **2.5 Análisis estadístico.**

Los resultados obtenidos durante las evaluaciones biológicas fueron sometidos a análisis estadístico de varianza (ANOVA), estadística descriptiva y potencias y tamaño de muestras, utilizando el programa estadístico SigmaStat® *Advisory Statistics for Scientists*.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1 Material fúngico.**

##### **3.1.1 Obtención de cepas para el estudio.**

El material fúngico fue proporcionado por la Facultad de Medicina de la UANL.

#### **3.2 Crecimiento *in vitro* del basidiomiceto.**

##### **3.2.1 Crecimiento de *L. lepideus* en medio sólido.**

Para la inoculación en el medio líquido, la biomasa se obtuvo a partir de la cepa aislada previamente obtenida en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la UANL.

### 3.2.2. Crecimiento de *L. lepideus* en medio líquido.

La inoculación del basidiomiceto se realizó según la metodología descrita en el punto 2.2.1.2 y 2.2.1.3. En la Figura 6, se aprecia a *L. lepideus* en distintos tiempos de crecimiento con su morfología y pigmentación características.



**Figura 6** Crecimiento de *L. lepideus* a distintos tiempos de incubación en medio Melin-Norkrans modificado. (A) A cuatro semanas de incubación en medio sólido; (B) a dos meses de crecimiento en medio líquido.

### 3.3. Estandarización del modelo animal de diabetes.

#### 3.3.1 Modelo animal de diabetes.

En el modelo se consideraron solo a las ratas 1, 2, 4 y 5 debido a que la tres no desarrolló diabetes. En la Tabla 14 se muestran las variaciones de glucosa en sangre de las ratas, desde que se encontraban con una glucemia normal, hasta el desarrollo final de la diabetes. Al mismo tiempo, se aprecia que después de las 24 horas, la hiperglucemia en las ratas diabéticas no disminuyó de los 200 mg/dL. La

rata tres a pesar de las marcadas variaciones en los niveles de glicemia que presentó durante el ensayo, no se consideró como diabética debido a que no tuvo una glucemia mayor a los 200 mg/dL como las otras ratas, al finalizar el ensayo.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de las concentraciones de glucosa plasmática del modelo animal de diabetes.

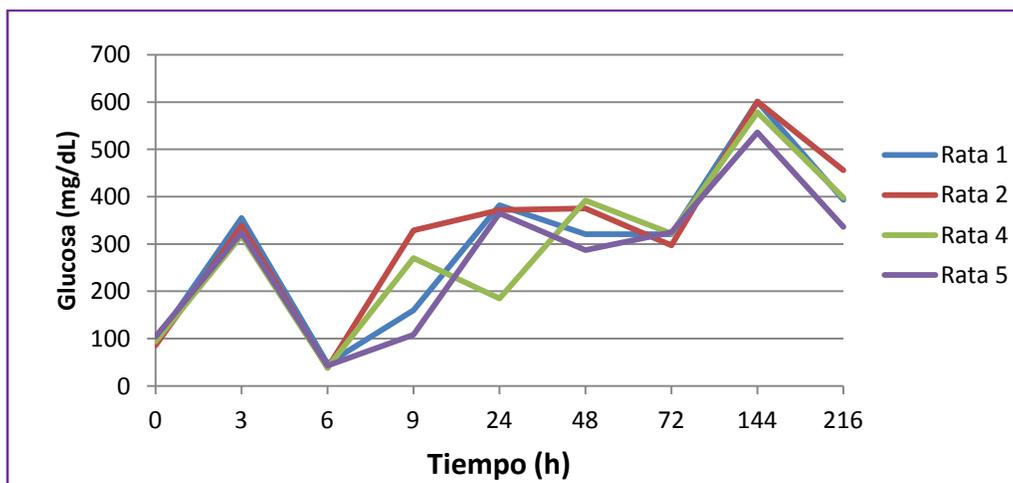
**Tabla 14** Concentración de glucosa plasmática expresada en mg/dL, a distintos tiempos en el modelo animal de diabetes.

<b>t</b> \ <b>Rata</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>t<sub>0</sub> (0 h)</b>	94	86	83	94	104
<b>t<sub>1</sub> (3 h)</b>	355	339	131	318	324
<b>t<sub>2</sub> (6 h)</b>	47	38	51	39	43
<b>t<sub>3</sub> (9h)</b>	160	329	134	270	108
<b>t<sub>4</sub> (24 h)</b>	382	372	369	185	365
<b>t<sub>5</sub> (48 h)</b>	321	375	115	392	287
<b>t<sub>6</sub> (72 h)</b>	321	297	135	322	325
<b>t<sub>7</sub> (144 h)</b>	> 600	> 600	120	578	536
<b>T<sub>8</sub> (216 h)</b>	393	456	85	398	336

Los resultados de las concentraciones de glucosa plasmática de la rata tres parecen mostrar un mecanismo de resistencia del organismo del animal hacia la administración de la STZ, mostrando reversibilidad en comparación con el resto de

los animales en estudio. La rata era inicialmente normoglucémica (83 mg/dL de glucosa en sangre), tuvo un aumento poco importante de glucosa y después, al igual que las otras, los valores disminuyeron considerablemente. A las 9 h, empezó el aumento de la concentración de glucosa, alcanzando un valor de 369 mg/dL a las 24 h. Pero, en el día siguiente de la administración de STZ, empezó la disminución de glucosa, lo que hace evidente la resistencia de la rata al efecto de la STZ; terminó el ensayo a las 216 h con una concentración de 85 mg/dL, mostrando con esto que el 80% de la población animal logró un desarrollo satisfactorio de diabetes.

Las ratas mantuvieron una glucosa mayor de 200 mg/dL a partir de las 48 horas de iniciado el proceso de diabetización. En la Figura 7 se muestra la variación de glucosa plasmática a lo largo de la evaluación.



**Figura 7.** Variación de glucosa plasmática del modelo animal de diabetes por STZ.

Conforme transcurrió el tiempo de la evaluación, las ratas aumentaron su ingesta de agua y disminuyeron un poco la de alimento.

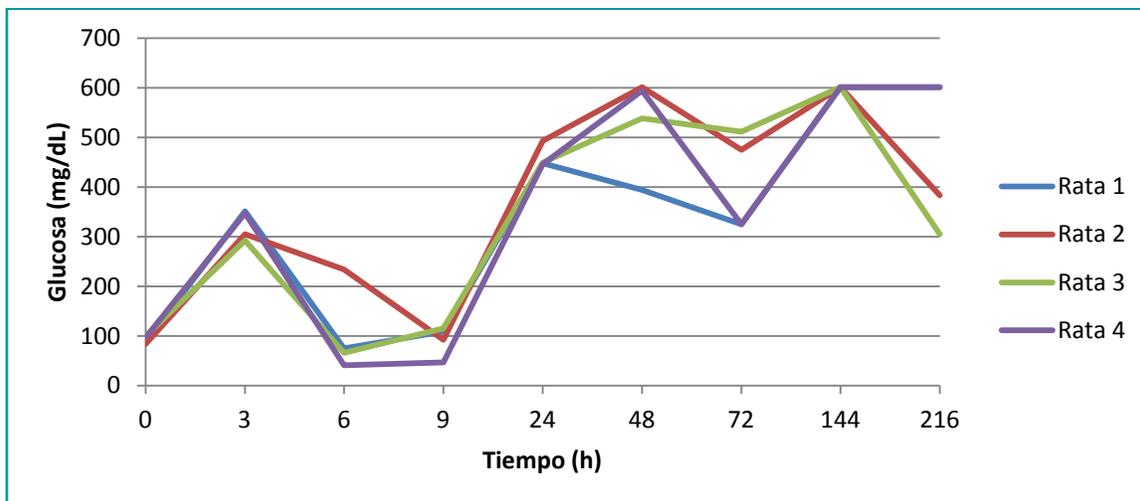
### 3.3.2 Réplica del modelo animal de diabetes.

Los cálculos para determinar las dosis de STZ en cada rata fueron similares al modelo. En la Tabla 15 se muestran los resultados de las mediciones de glucosa plasmática de las ratas en la réplica del modelo animal de diabetes; puede apreciarse que las variaciones de la réplica son similares a las fluctuaciones de glucosa plasmática observadas en el modelo.

**Tabla 15** Concentración de glucosa plasmática expresada en mg/dL a distintos tiempos en la réplica del modelo de diabetes en animales.

<b>Rata</b> <b>T</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>t<sub>0</sub> (0 h)</b>	87	84	100	97	91
<b>t<sub>1</sub> (3 h)</b>	351	305	292	347	125
<b>t<sub>2</sub> (6 h)</b>	75	234	66	41	108
<b>t<sub>3</sub> (9 h)</b>	109	92	115	47	101
<b>t<sub>4</sub> (24 h)</b>	448	493	449	446	126
<b>t<sub>5</sub> (48 h)</b>	394	> 600	538	594	164
<b>T<sub>6</sub> (216 h)</b>	> 600	383	305	> 600	108

En la réplica, se observa la glucemia normal inicial de los animales y que, después de las 24 a 48 horas inicia la hiperglucemia marcada, con valores similares al modelo (ver Figura 8).



**Figura 8.** Variación de glucosa plasmática de la réplica del modelo animal de diabetes por STZ.

De modo similar al modelo, cuatro de las cinco ratas evaluadas lograron desarrollar diabetes, debido a que la rata cinco quedó con valores normoglucémicos y en todas aquellas diabéticas, la glucosa superó los 200 mg/dL en sangre, después de las 48 horas. Durante el proceso se apreció una fluctuación importante del peso de los animales, donde se presentó una disminución de peso de entre 10 a 15% respecto a su peso inicial.

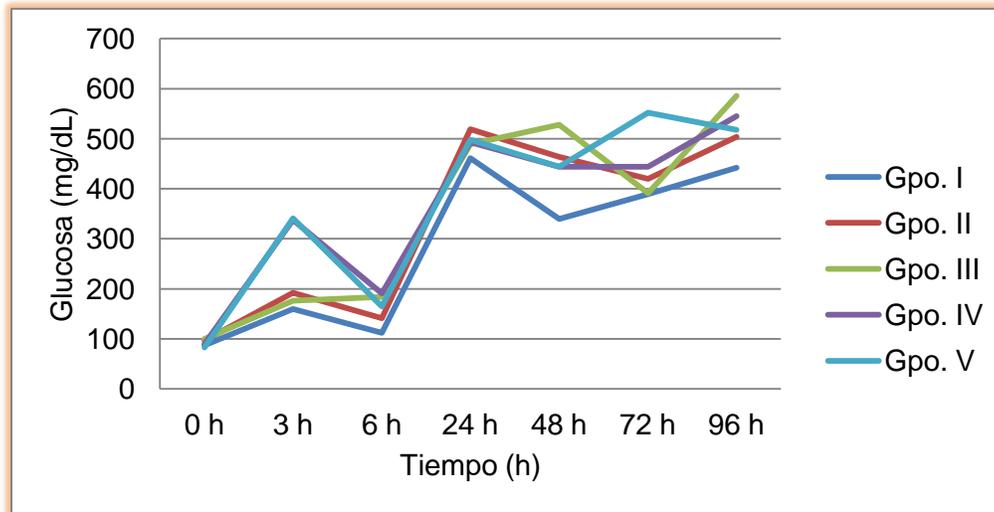
### **3.4 Evaluación de la actividad biológica del Exto MeOH de *L. lepideus*.**

#### **3.4.1 Evaluación en ratas normoglucémicas diabetizadas con STZ.**

##### **3.4.1.1 Diabetización de las ratas a utilizar en la evaluación de la actividad antidiabética del Exto MeOH de *L. lepideus*.**

La diabetización se realizó según el modelo animal de diabetes establecido en el presente trabajo, mostrado en los puntos 2.2.4.1.

En este grupo de animales, la glucosa plasmática logró un comportamiento semejante a lo obtenido anteriormente en los resultados del modelo animal y en su réplica, por lo que se inició con la administración del Exto MeOH al noveno día, donde se presentaron valores altos, con más de 200 mg/dL y se observó que no había reversibilidad en la diabetes causada por la STZ. En la Figura 10 se muestran las concentraciones plasmáticas de glucosa de todos los grupos de ratas que fueron sometidos a diabetización por STZ.



**Figura 9.** Concentraciones de glucosa plasmática expresadas en mg/dL, de las ratas sometidas a diabetización para la evaluación del Exto MeOH de *L. lepideus*.

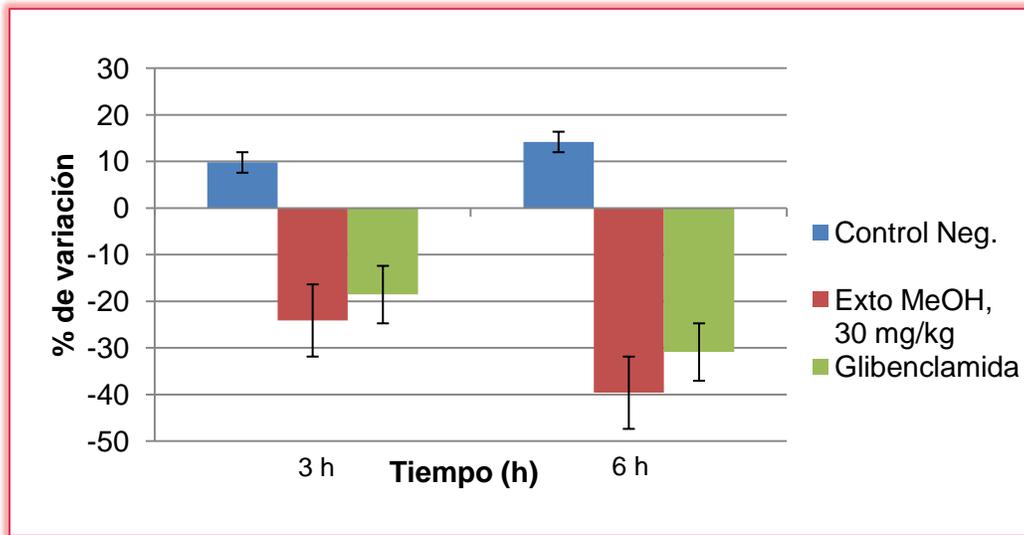
Para el último día de la evaluación, los niveles de glucosa en los grupos que se utilizarían posteriormente para la administración del Exto MeOH, fueron mayores a 400 mg/dL.

Durante el ensayo, perecieron tres ratas que pertenecían a los grupos del vehículo, glibenclamida y de la dosis de 300 mg/kg de peso de la rata del Exto MeOH del basidiomiceto, respectivamente. Las ratas muertas no fueron consideradas para el análisis de los resultados. Adicionalmente, una rata perteneciente al grupo de la dosis de 100 mg/kg del Exto MeOH, también fue descartada del estudio debido a que no desarrolló diabetes.

### **3.4.1.2 Evaluación de la actividad antidiabética del Exto MeOH de *L. lepideus* en ratas diabetizadas.**

Después de haber alcanzado los valores de glucemia esperados en las ratas diabetizadas (véase punto 3.4.1.1), se continuó con la evaluación del Exto MeOH por siete días y se encontró que la mayor disminución de glucosa la obtuvo el grupo al cual se le administró la dosis de 30 mg/kg de Exto MeOH durante el tercer día, al disminuir hasta en 32% la glucosa plasmática; mientras que el control positivo, la glibenclamida, disminuyó la glucosa en 28%.

El promedio de las concentraciones plasmáticas de los grupos con las dosis de vehículo, glibenclamida y de 30 mg/kg del Exto MeOH de *L. lepideus*, se representan como Grupos I, II y V, respectivamente, en la Figura 11; el grupo del Exto MeOH tuvo una mayor reducción del valor de glucosa plasmática que al que se le administró glibenclamida, aunque la diferencia del efecto no fue tan significativo en la tercera hora del ensayo, fue más marcado durante la sexta hora, indicando así un probable efecto terapéutico.

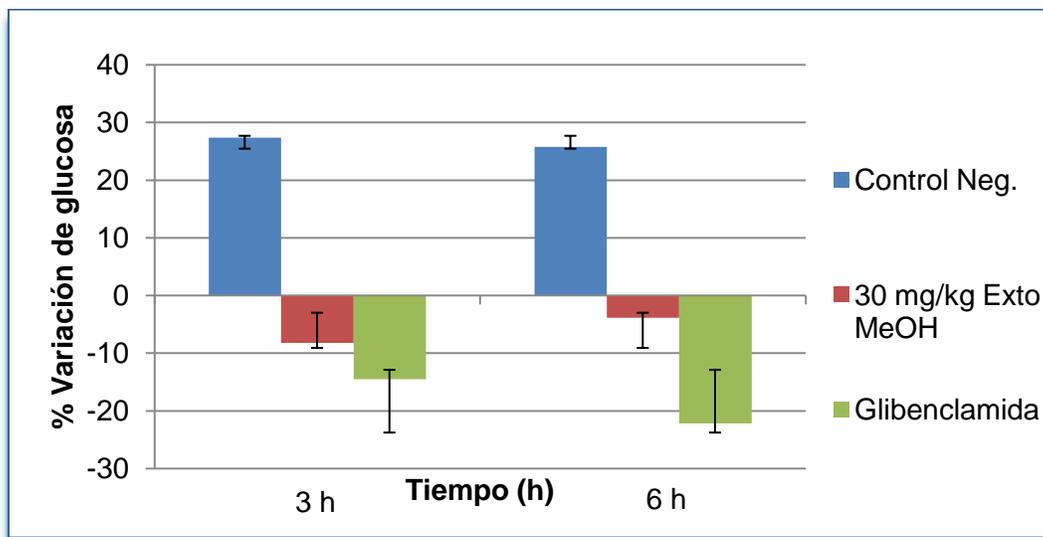


**Figura 10.** Variaciones de las concentraciones de glucosa plasmática en mg/dL de los grupos de las dosis de Tween 80, glibenclamida y Exto MeOH a 30 mg/kg, en la evaluación del Exto MeOH de *L. lepideus* en ratas diabetizadas, con respecto a los valores originales de glucosa plasmática.

Cabe destacar que la evaluación del Exto MeOH de *L. lepideus* en ratas diabetizadas se realizó para confirmar la reproducibilidad de la actividad antidiabética previamente reportada por nuestros colaboradores en la Facultad de Medicina de la UANL. Los resultados obtenidos de la evaluación del Exto MeOH fueron consistentes con los datos publicados por Tamez de la O y cols., por lo cual se decidió continuar con el trabajo fitoquímico y farmacológico del extracto sin realizar el ensayo por triplicado que conduzca a la obtención de datos para análisis estadístico <sup>40</sup>.

### 3.4.2 Evaluación de la actividad antidiabética del Exto MeOH de *L. lepidus* en ratas normoglucémicas.

La valoración del Exto MeOH de *L. lepidus* se realizó conforme a lo efectuado para el grupo de ratas diabetizadas y se procedió de forma semejante; excepto porque se utilizaron cuatro ratas, en vez de cinco, debido a que la probabilidad de que se presentara muerte en el grupo animal se reduce al no administrárseles el agente diabetógeno. El ensayo se llevó a cabo según lo descrito en el punto 2.2.4.1. La Figura 12 muestra los promedios, por hora, de las concentraciones de glucosa en sangre en mg/dL, en la cual se observa un ligero descenso en la glucosa en el grupo de las ratas que tuvo la dosis de 30 mg/dL, pero mucho menor a lo obtenido por el grupo que se le administró la dosis de glibenclamida.



**Figura 11.** Variaciones de las concentraciones de glucosa en mg/dL de los grupos de las dosis de Tween 80, glibenclamida y Exto MeOH a 30 mg/kg en la evaluación del Exto MeOH de *L. lepidus* en ratas normoglucémicas.

### 3.5 Aislamiento y caracterización estructural de los compuestos puros obtenidos a partir de *L. lepideus*.

#### 3.5.1. Obtención del Exto MeOH de *L. lepideus*.

Del cultivo líquido de *L. lepideus*, se obtuvieron 120 g de biomasa seca, la cual se maceró con metanol y se obtuvieron 26 g de Exto MeOH, lo que corresponde a un rendimiento de 21.6%. Veinte gramos del Exto MeOH se sometieron a una cromatografía en columna (C.C.) de vidrio.

De la C.C., se obtuvieron 308 fracciones de 250 mL cada una, las cuales se reunieron por similitud cromatográfica, en 12 fracciones principales (ver Tabla 16).

**Tabla 16.** Fracciones principales obtenidas a partir de la C.C. del Exto MeOH de *L. lepideus*.

Eluato	Fase Móvil	Proporción (%)	Fracción
1 - 10	Hex → Hex:AcOEt	100 → 95:5	A
11 - 20	Hex:AcOEt	95:5	B
21 - 35	Hex:AcOEt	95:5 → 90:10	C
36 - 45	Hex:AcOEt	90:10 → 80:20	D
46 - 70	Hex:AcOEt	80:20 → 65:35	E

Tabla 16 (Continúa)

<b>71 – 127</b>	Hex:AcOEt → AcOEt	65:35 → 100	F
<b>128 – 160</b>	AcOEt	100 → 90:10	G
<b>161 – 207</b>	AcOEt:MeOH	90:10 → 65:25	H
<b>208 – 249</b>	AcOEt:MeOH	65:25 → 50:50	I
<b>250 – 284</b>	AcOEt:MeOH	40:60 → 20:80	J
<b>285 – 298</b>	AcOEt:MeOH	20:80 → 10:90	K
<b>299 - 308</b>	MeOH	100	L

Algunas fracciones no fueron incorporadas a las fracciones principales porque presentaban un precipitado que fue separado por filtración en embudo Büchner y recristalizado con diferentes disolventes. Tal fue el caso de las fracciones F17 (AH-2) y F36-44 (AH-5), que fueron obtenidas con mezclas de Hex:AcOEt en gradiente de polaridad. En la Tabla 17 se observan las cromatografías en placa fina (C.P.F.) correspondientes a F17 y F36-44, y las condiciones a las que se eluyeron dichas placas.

**Tabla 17.** Fracciones seleccionadas para ser analizadas por RMN, obtenidas a partir del Exto MeOH de *L. lepideus*.

Fracción	Imagen	Polaridad
F17 (AH-2)		Hex:AcOEt, 85:15 TLC, 1x4 cm. UV-Vis, a 254 nm.
F36-44 (AH-5)		Hex:AcOEt, 75:25 TLC, 1x4 cm. Revelador: sulfato cérico amoniacal.

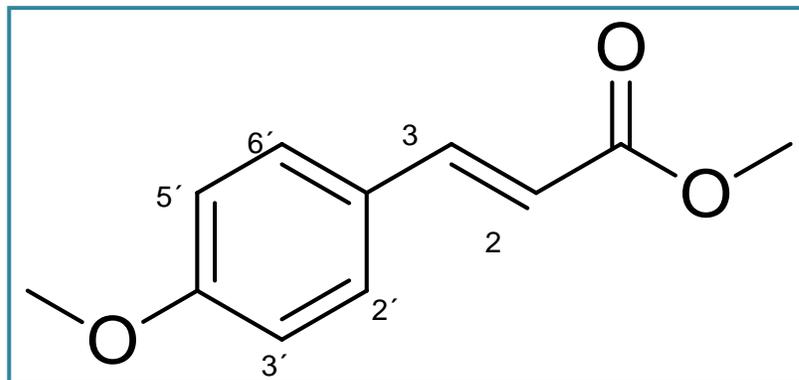
### 3.5.2. Compuesto AH-2, obtenido de la fracción F17.

El compuesto AH-2 precipitó como un sólido blanco en la fracción 17, obtenida en la polaridad de Hex:AcOEt, 95:5 a partir de la C.C. del Exto MeOH de *L. lepideus*. Dicho sólido blanco fue recristalizado en forma de agujas mediante evaporación lenta de acetato de etilo, obteniéndose 420 mg. Los datos del compuesto AH-2 se presentan en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Datos cromatográficos y físicos del compuesto AH-2, obtenido de la fracción F17.

Compuesto	Imagen	Datos cromatográficos y físicos
AH-2		<p>Pf = 84-87 °C</p> <p>Rf = 0.35</p> <p>Hex:AcOEt, 85:15</p> <p>TLC, 1x4 cm</p> <p>Revelador: sulfato cérico amoniacal</p>

Después de realizar el análisis mediante RMN, el compuesto fue identificado como *p*-metoxicinamato de metilo (AH-2), con base en sus propiedades espectroscópicas experimentales (ver Figura 12).



**Figura 12.** Estructura del *p*-metoxicinamato de metilo (AH-2).

A continuación se muestran los datos espectroscópicos de AH-2, obtenido de la fracción F17:

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>ppm</sub>: 7.64 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-7), 7.48 (2H, d, *J* = 2.0, 8.7 Hz, H-2, H-6), 6.89 (*J* = 2.0, 8.7 Hz, H-3, H-5), 6.298 (1H, d, *J* = 16.2 Hz, H-8), 3.82 (3H, s, Ar-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (3H, s, -COOCH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>ppm</sub>: 167.69 (C1), 161.32 (C4'), 144.45 (C3), 129.66 (C2', C6'), 127.04 (C1'), 115.19 (C2), 114.25 (C3', C5'), 55.30 (C4), 51.51 (C10).

### **3.5.2.1 Elucidación estructural del compuesto AH-2, obtenido de la fracción F17.**

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Figura 13), exhibió un patrón de señales característico de un compuesto aromático *para*-disustituido, aunado a un sistema transvinílico. En la región de campo bajo se observan dos señales dobles en δ 7.64 (*J* = 16.2 Hz, H-3) y 6.89 ppm (*J* = 16.2 Hz, H-2) atribuibles a protones vinílicos con constantes de acoplamiento características de un sistema *trans*. En esta misma región se observan dos dobletes de cuartetos que resuenan en δ 7.48 (*J* = 2.0, 8.7 Hz, H-2, H-6) y 6.89 ppm (*J* = 2.0, 8.7 Hz, H-3, H-5), (*J* = 2.0, 8.7 Hz). Los dos grupos de señales integran para dos protones cada uno y fueron atribuidos a un sistema de protones AA'BB', que es característico de bencenos

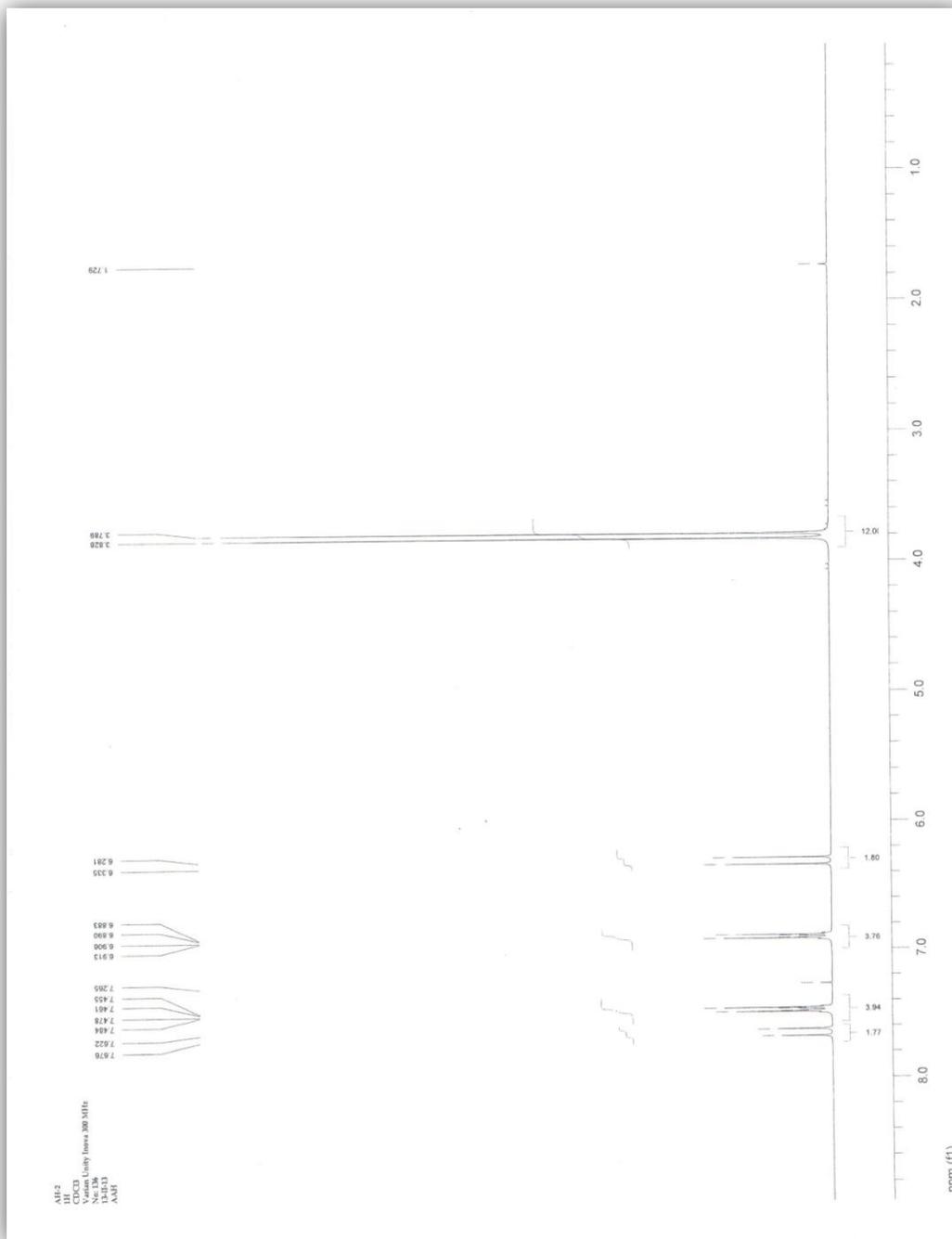
*para*-disustituidos con protones químicamente equivalentes, pero magnéticamente diferentes.

De acuerdo con el tipo de carbonos observados en el experimento DEPT-135 (Figura 14) se confirman los seis carbonos del benceno y los dos carbonos del sistema vinílico, si se considera que en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Figura 15) se observan 11 señales, de las cuales seis fueron asignadas al benceno y dos al vinilo, las tres señales restantes fueron asignadas, en co-análisis con el espectro DEPT-135, a un carbonilo de éster  $\alpha,\beta$ -insaturado y a dos metilos de grupo metoxilo. Los grupos metoxilos fueron confirmados por el espectro de RMN-<sup>1</sup>H con la presencia de dos señales simples que integran para tres protones cada una y que resuenan en  $\delta$  3.82 (Ar-OCH<sub>3</sub>) y 3.78 ppm (-COOCH<sub>3</sub>). La comparación de los datos espectroscópicos observados para el compuesto AH-2 con los reportados en la literatura, permitieron establecer la identidad de AH-2 como *p*-metoxicinamato de metilo (ver Tabla 19) <sup>60</sup>.

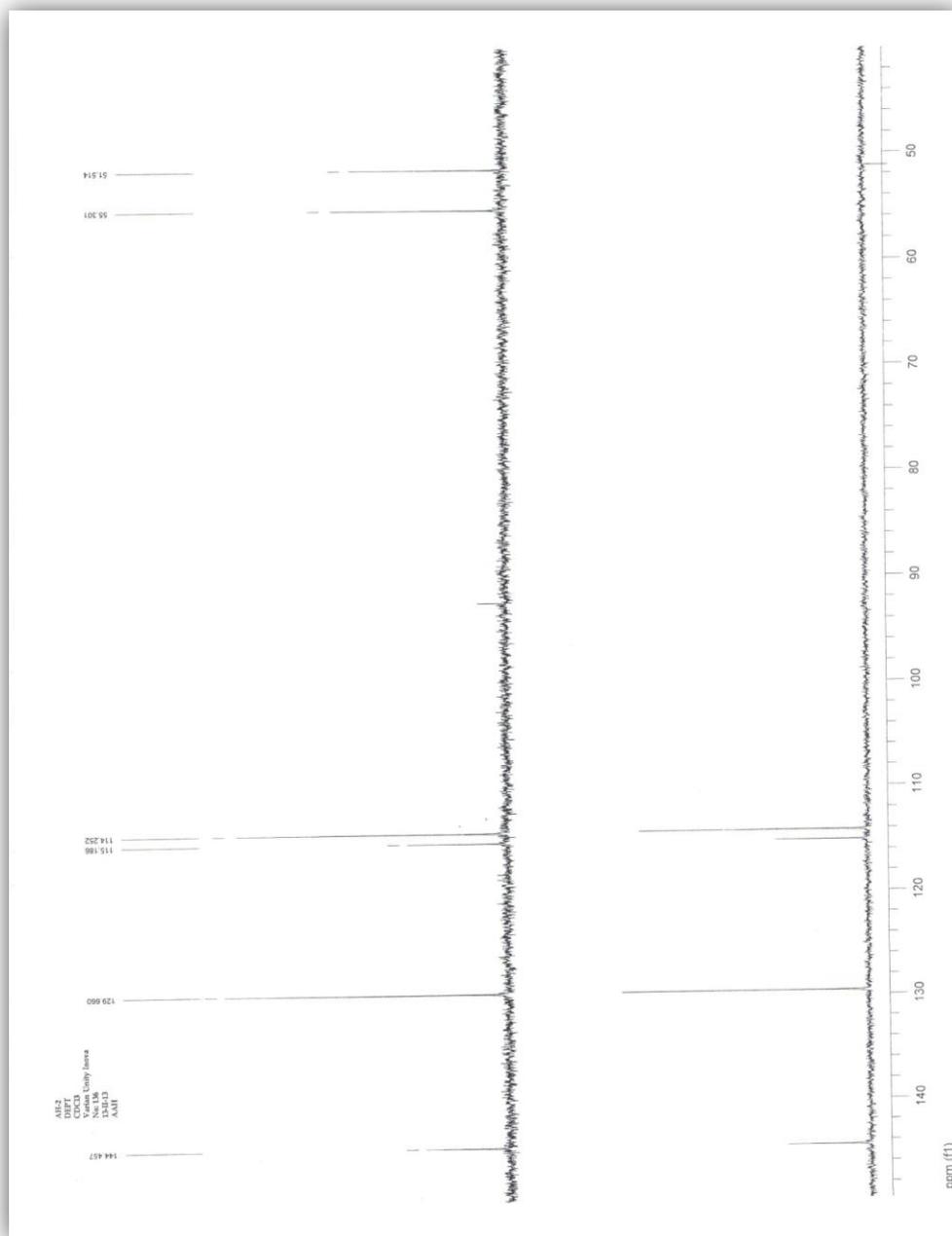
**Tabla 19.** Datos espectroscópicos del *p*-metoxicinamato de metilo.

<i>p</i> -metoxicinamato de metilo					
RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )			RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		
Hidrógeno	RMN <sup>1</sup> H <sub>Exp.</sub> δppm (m, J <sub>Hz</sub> )	RMN <sup>1</sup> H <sub>Lit.</sub> δppm (m, J <sub>Hz</sub> )	Carbono	RMN <sup>13</sup> C <sub>Exp.</sub> δppm	RMN <sup>13</sup> C <sub>Lit.</sub> δppm
<b>7</b>	7.64 (d, J = 16.2 Hz, H-7)	7.66 (d, J = 15.6 Hz, 1H).	1	167.69	168.0
<b>2, 6</b>	7.48 (d, J = 2.0, 8.7 Hz, H-2, H-6)	7.48 (d, J = 8.4 Hz, 2H)	4'	161.32	161.7
<b>3, 5</b>	6.89 (dd, J = 2.0, 8.7 Hz, H-3, H-5)	6.91(d, J = 8.4 Hz, 2H),	3	144.45	144.8
<b>8</b>	6.298 (d, J = 16.2 Hz, H-8)	6.32 (d, J = 16.0 Hz, 1H),	2', 6'	129.66	130.0
<b>4</b>	3.82 (s, CH <sub>3</sub> O- Ar)	3.84 (s, 3H)	1'	127.04	127.3
<b>10</b>	3.78 (s, - Ar- OCH <sub>3</sub> )	3.80 (s, 3H)	2	115.19	115.5
			3', C5'	114.25	114.6
			4	55.30	55.7
			10	51.51	51.9

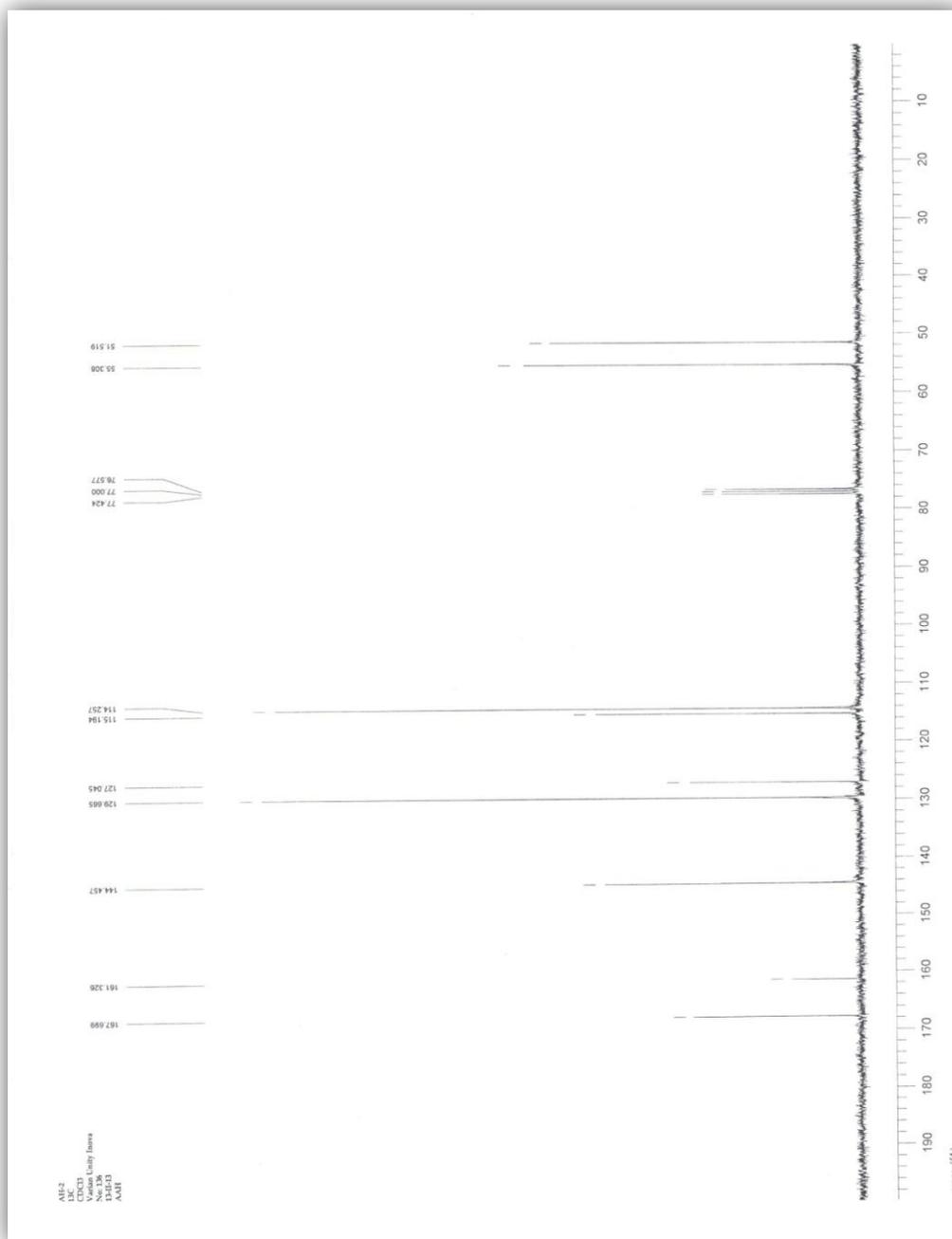
Exp.= experimental, Lit.= literatura. Tomado de Sun, P. *et al.* 2012.



**Figura 13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), del compuesto AH-2.



**Figura 14.** Espectro de RMN DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto AH-2.



**Figura 15.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto AH-2.

### 3.5.3 Compuesto AH-5, obtenido de las fracciones F36-44.

El compuesto AH-5 precipitó como un sólido blanco cristalino a partir de las fracciones 36-44, recuperadas a partir del Exto MeOH de *L. lepidus*, en la polaridad de Hex:AcOEt, 9:1 a 8:2 de la C.C. Este sólido se recrystalizó por evaporación lenta con cloroformo en forma de agujas finas, obteniéndose 250 mg. El compuesto fue identificado como ergosterol (ver Figura 16), y en la Tabla 20 se muestran algunos datos cromatográficos del compuesto.

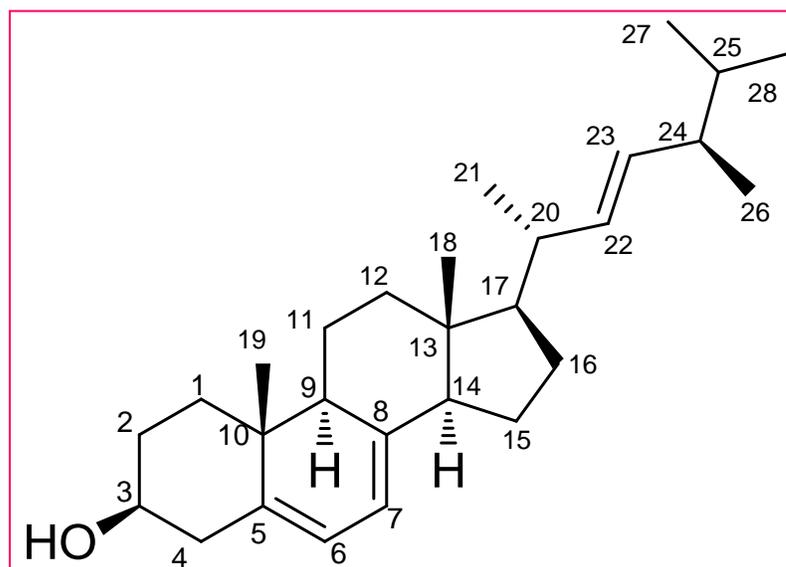


Figura 16. Estructura del ergosterol (AH-5).

**Tabla 20.** Datos cromatográficos y físicos del compuesto AH-5, recuperado de las fracciones F36-44.

Compuesto	Imagen	Datos cromatográficos y físicos
AH-5		<p>Pf = 155-158 °C</p> <p>Rf = 0.21</p> <p>Hex:AcOEt, 75:25</p> <p>TLC, 1x4 cm</p> <p>Revelador: sulfato cérico amoniacal</p>

Los datos espectroscópicos de AH-5, obtenido de las fracciones F37-44 son:

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) : 5.57 (1H, dd, *J* = 2.4, 5.7 Hz, H-7), 5.38 (1H, dd, *J* = 2.4, 5.7 Hz, H-6), 5.21 (1H, dd, *J* = 15.0, 5.4 Hz, H-23), 5.17 (1H, dd, *J* = 15.0, 5.4 Hz, H-22), 3.63 (1H, m, H-3), 2.47 (1H, ddd, *J* = 1.8, 6.6, 14.4 Hz, H-20), 2.28 (1H, ta, *J* = 13.8 Hz, H-24), 2.09-1.20 (18H, m, H<sub>2</sub>-1, H<sub>2</sub>-2, H<sub>2</sub>-4, H-9, H<sub>2</sub>-11, H<sub>2</sub>-12, H-14, H<sub>2</sub>-15, H<sub>2</sub>-16, H-17, H-25), 1.03 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H<sub>3</sub>-21), 0.94 (3H, s, H<sub>3</sub>-19), 0.92 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H<sub>3</sub>-28), 0.83 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H<sub>3</sub>-27), 0.82 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H<sub>3</sub>-26), 0.63 (3H, s, H<sub>3</sub>-18).

RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δppm: 141.3 (C-8), 139.7 (C-5), 135.5 (C-22), 131.9 (C-23), 119.9 (C-6), 116.2 (C-7), 70.4 (C-3), 55.6 (C-17), 54.5 (C-14), 46.2 (C-9), 42.8 (C-13 y C-14), 40.7 (C-4), 40.4 (C-20), 39.0 (C-12), 38.3 (C-1), 37.0 (C-10), 33.0 (C-25), 31.9 (C-2), 28.2 (C-16), 22.9 (C-15), 21.09 (C-11 y C-21), 19.9 (C-27), 19.6 (C-26), 17.5 (C-19), 16.2 (C-28), 12.0 (C-18).

### **3.5.3.1 Elucidación estructural del compuesto AH-5, obtenido de las fracciones F36-44.**

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Figura 17), del compuesto AH-5 presentó tres grupos de señales con desplazamientos químicos característicos de protones vinílicos ( $\delta_{\text{H}}$  5.57-5.17 ppm), confirmados con las señales de sus carbonos correspondientes ( $\delta_{\text{C}}$  141-116 ppm) del espectro de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Figura 18). La señal doble, resonante en  $\delta$  5.57, fue atribuída al protón H-7 por sus constantes de acoplamiento ( $J = 2.4, 5.7$  Hz) que indicaron su acoplamiento con la señal resonante en 5.38 (1H, dd,  $J = 2.4, 5.7$  Hz) del protón vinílico vecino H-6. En la región cercana a las señales de H-6 y H-7 se encuentran dos grupos de señales característicos de un sistema de protones vinílicos con configuración *trans*; es decir, se observan dos sistemas de señales doble de dobles en  $\delta$  5.21 (H-23) y 5.17 (H-22) con una  $J = 15$  Hz.

Por otra parte, el espectro de hidrógeno muestra un multiplete en  $\delta_H$  3.63 ppm que corresponde a un protón geminal a grupo hidroxilo (H-3) y que se confirma por su señal de carbono resonante en  $\delta_C$  70.4 ppm. Adicionalmente, el espectro de protón exhibe seis grupos de señales a campo alto ( $\delta$  1.04-0.63 ppm), las cuales integran para tres hidrógenos cada una y corresponden a grupos metilo con y sin acoplamiento a grupos metinos. El análisis del espectro de hidrógeno sólo permitió deducir que AH-5 podía corresponder a un esteroide o un triterpeno de acuerdo con el número de hidrógenos exhibidos. Para esclarecer esto, fue necesario recurrir al espectro de RMN- $^{13}C$  (Figura 18) y al experimento DEPT-135. El número de señales observadas en el espectro de carbono (Figura 19) aunado al tipo de carbono derivado del experimento DEPT-135, permitieron deducir que el compuesto AH-5 correspondía a un compuesto de 28 carbonos.

Al comparar los datos espectroscópicos experimentales de AH-5 con los reportados en la literatura (véase Tabla 21), fue posible establecer que AH-5 corresponde al esteroide llamado ergosterol<sup>57</sup>.

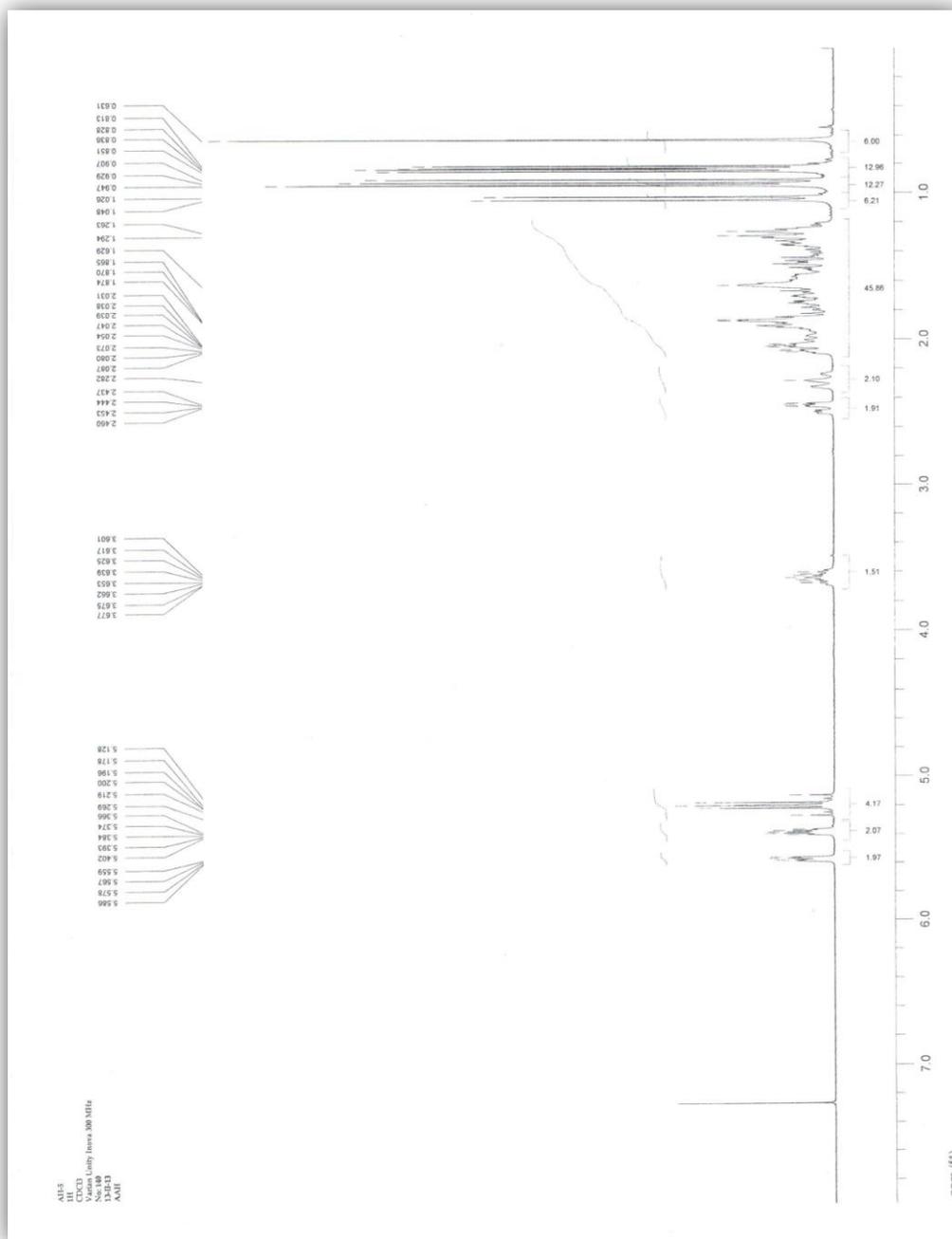
**Tabla 21.** Datos espectroscópicos del ergosterol.

Ergosterol					
Hidrógeno	RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )		Carbono	RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	
	RMN <sup>1</sup> H <sub>Exp.</sub> δppm (m, J <sub>Hz</sub> )	RMN <sup>1</sup> H <sub>Lit.</sub> δppm (m, J <sub>Hz</sub> )		RMN <sup>13</sup> C <sub>Exp.</sub> δppm	RMN <sup>13</sup> C <sub>Lit.</sub> δppm
<b>7</b>	5.57 (dd, J = 2.4, 5.7 Hz, H-7)	5.58 (1H, m)	8	141.3	141.5
<b>6</b>	5.38 (dd, J = 2.4, 5.7 Hz, H-6),	5.39 (1H, m)	5	139.7	139.9
<b>23</b>	5.21 (dd, J = 15.0, 5.4 Hz, H-23)	5.22 (1H, dd, J = 15.2, 8.0 Hz)	22	131.9	135.5
<b>22</b>	5.17 (dd, J = 15.0, 5.4 Hz, H-22)	5.18 (1H, dd, J = 15.2, 8.0Hz,)	23	135.5	132.0
<b>3</b>	3.63 (m, H-3),	3.63 (1H, m)	6	119.9	119.7
<b>20</b>	2.47 (ddd, J = 1.8, 6.6, 14.4 Hz, H-20)		7	116.2	116.4
<b>24</b>	2.28 (t, J = 13.8 Hz, H-24),		3	70.4	70.6
<b>17, 25</b>	2.09 - 1.20 (m, H <sub>2</sub> -1, H <sub>2</sub> -2, H <sub>2</sub> -4, H-9, H <sub>2</sub> -11, H <sub>2</sub> -12, H-14, H <sub>2</sub> -15, H <sub>2</sub> -16, H-17, H-25)		17	55.6	55.8
<b>21</b>	1.03 (d, J = 6.6 Hz, H <sub>3</sub> -21)	1.04 (3H, d, J = 6.6 Hz)	13, 14	42.8	54.7
<b>19</b>	0.94 (s, H <sub>3</sub> -19)	0.95 (3H, s)	9	46.2	46.4
<b>28</b>	0.92 (d, J = 6.6 Hz, H <sub>3</sub> -28)	0.92 (3H, d, J = 6.8 Hz)	24	42.803	42.9
<b>27</b>	0.83 (d, J = 6.6 Hz, H <sub>3</sub> -27)	0.84 (3H, d, J = 6.4 Hz)	20	40.4	
<b>26</b>	0.82 (d, J = 6.6 Hz, H <sub>3</sub> -26)	0.83 (3H, d, J = 6.7 Hz)	4	40.7	40.8
<b>18</b>	0.63 (s, H <sub>3</sub> -18)	0.63 (3H, s)	12	39.0	39.0
			1	38.3	38.3
			10	37.0	37.1

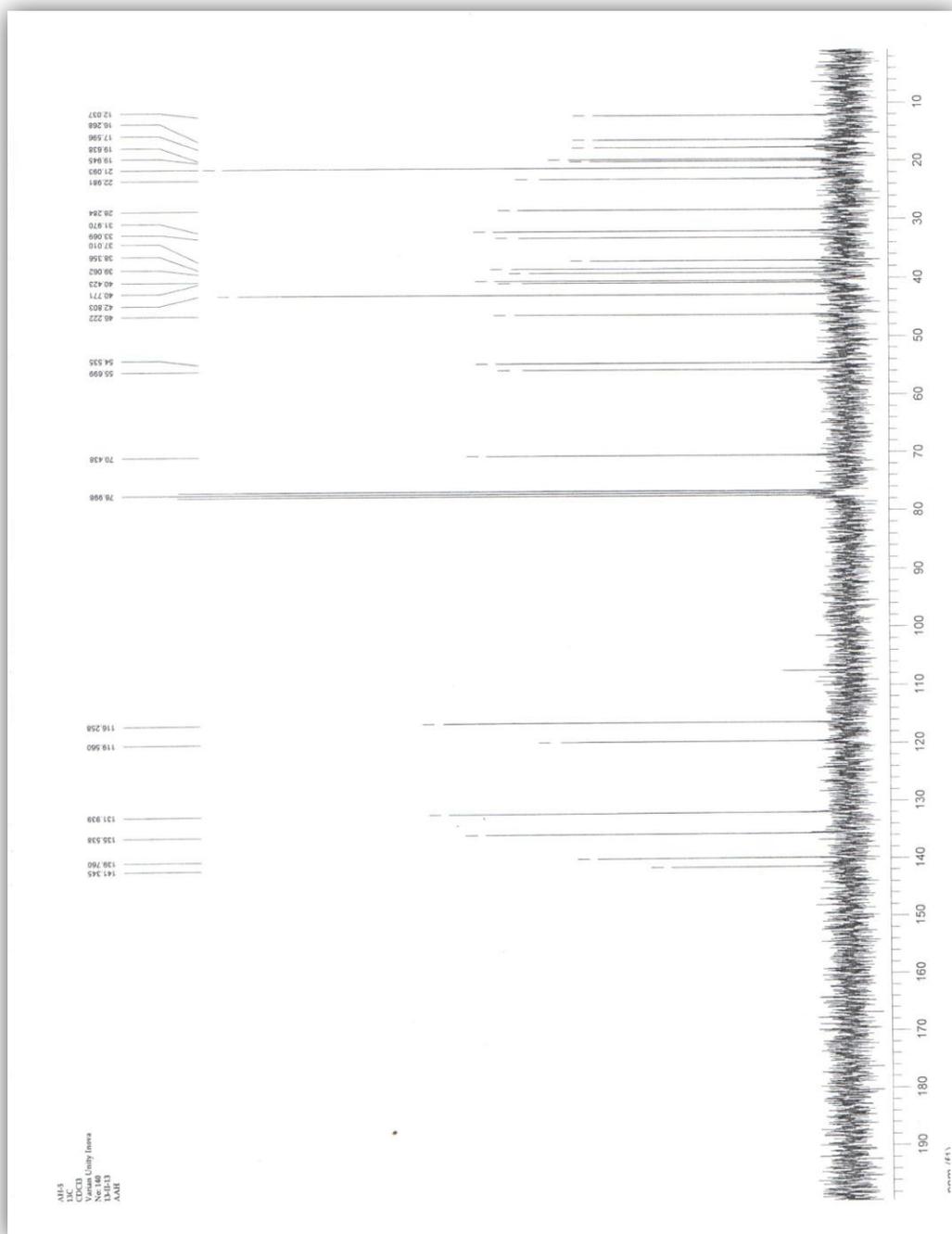
Tabla 21 (Continúa)

	25	33.0	33.2
	2	31.9	32.1
	16	28.2	28.4
	15	22.9	23.1
	11, 21	21.09	21.2
	27	19.9	
	26	19.6	19.8
	19	17.5	17.7
	28	16.2	16.4
	18	12.0	12.2

Exp.= experimental; Lit.= literatura. Referencia tomada de Chen, D. Q. *et al.* 2013.



**Figura 18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), del compuesto AH-5.



**Figura 19.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto AH-5.

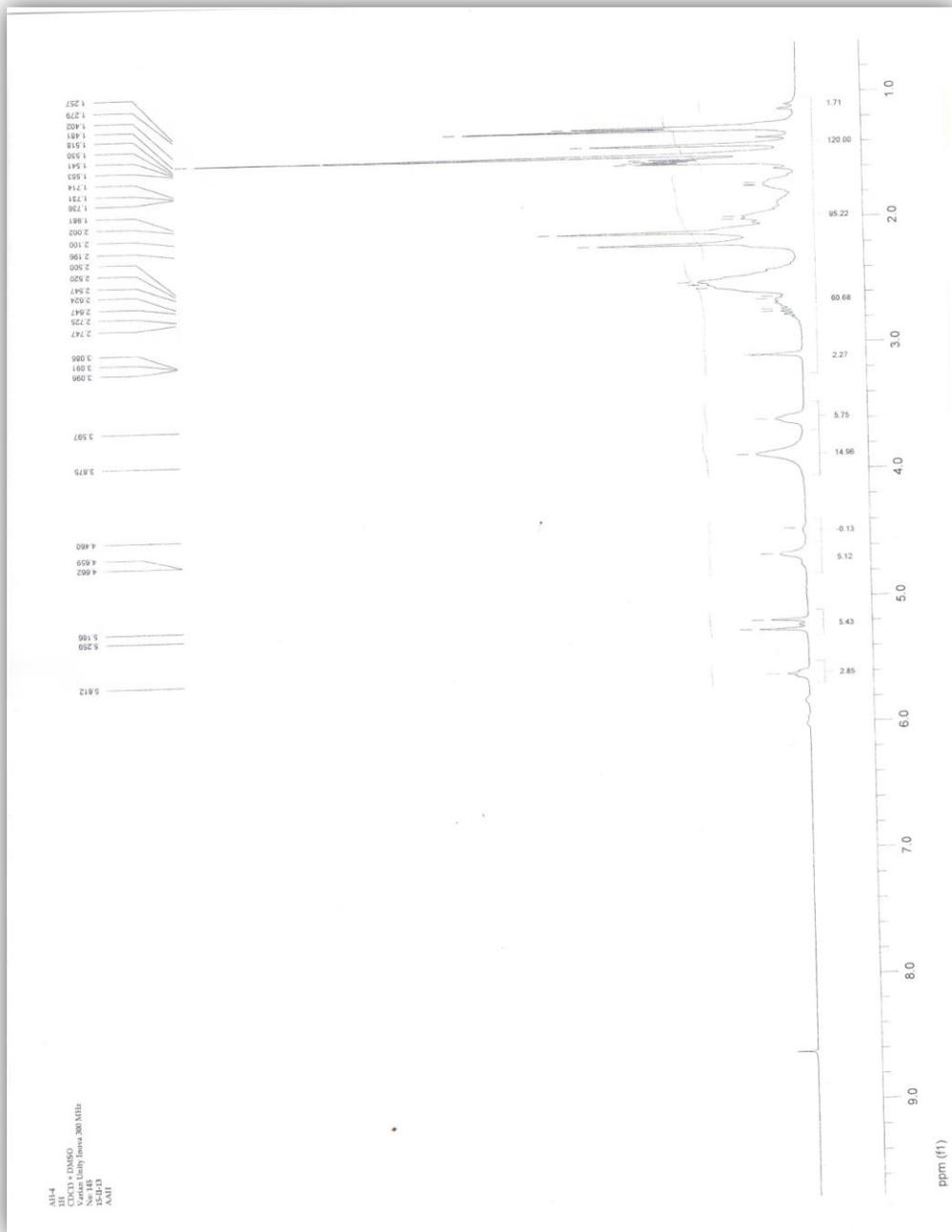
### 3.5.3. Compuesto AH-4, obtenido de las fracciones F71-127.

El compuesto AH-4 al igual que AH-2 y AH-5 precipitó en forma de sólido blanco en las fracciones 71 a 127, obtenido de la C.C. del Exto MeOH de *L. lepideus*, dentro las polaridades Hex:AcOEt → AcOEt, 65:35 → 100. De este compuesto, se logró obtener casi 700 mg. Los datos del compuesto AH-4 son mostrados en la Tabla 22:

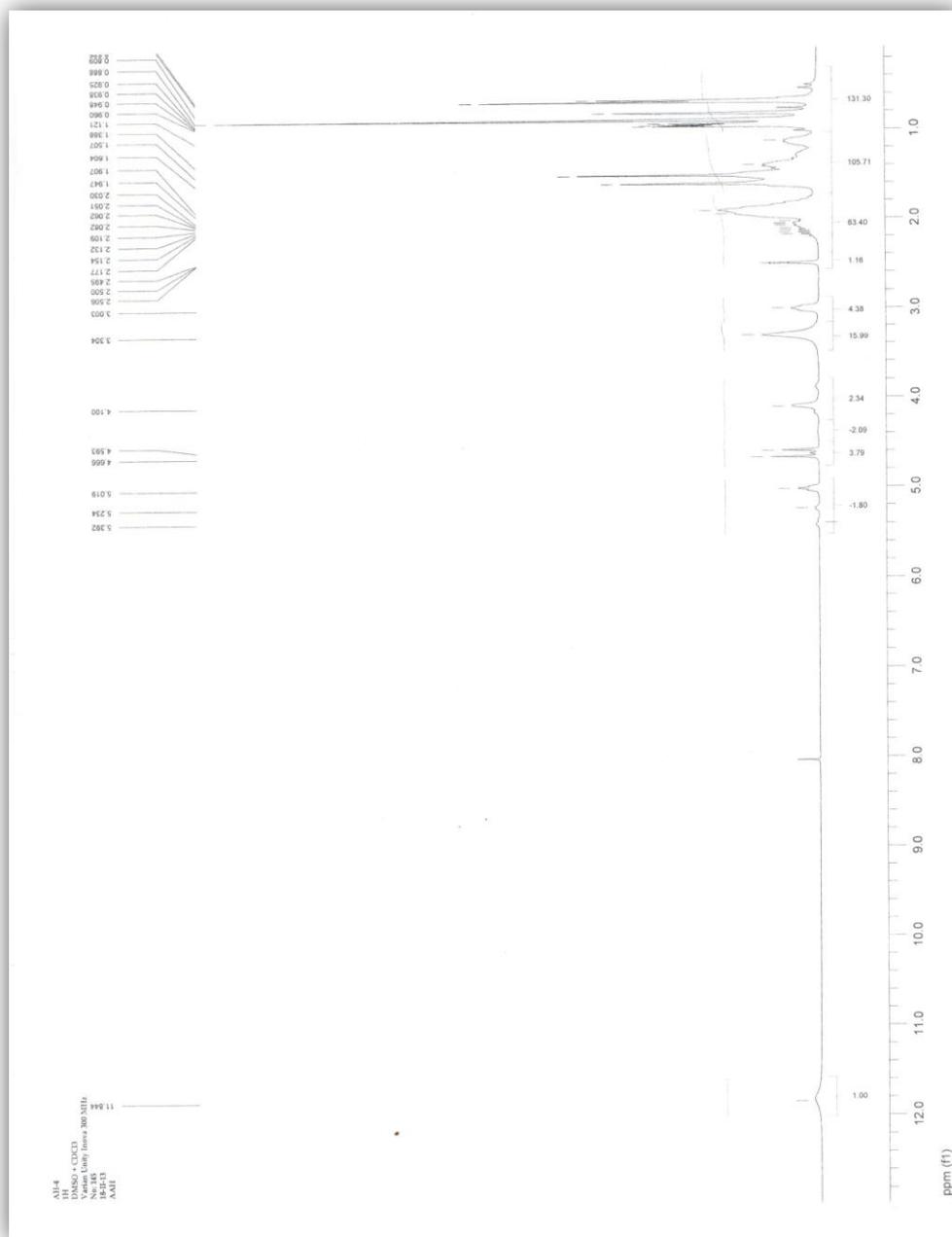
**Tabla 22.** Datos cromatográficos y físicos del compuesto AH-4.

Compuesto	Imagen	Datos cromatográficos y físicos
AH-5		Pf = 270-273 °C Rf = 0.33 Hex:AcOEt, 8:2 TLC, 1x4 cm Revelador: sulfato cérico amoniacal

Este compuesto, AH-4, fue analizado por RMN-<sup>1</sup>H (Figura 20) y -<sup>13</sup>C (Figura 21) mostrando un patrón de señales característico de un esteroide, pero su elucidación estructural continúa en proceso debido a la complejidad que mostró en la región de campo alto de ambos espectros.



**Figura 20.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de compuesto AH-4.



**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de compuesto AH-4.

### 3.6 Evaluación de la actividad biológica del compuesto AH-4 obtenido a partir del Exto MeOH de *L. lepideus*.

#### 3.6.1 Evaluación en ratas normoglucémicas diabetizadas con STZ.

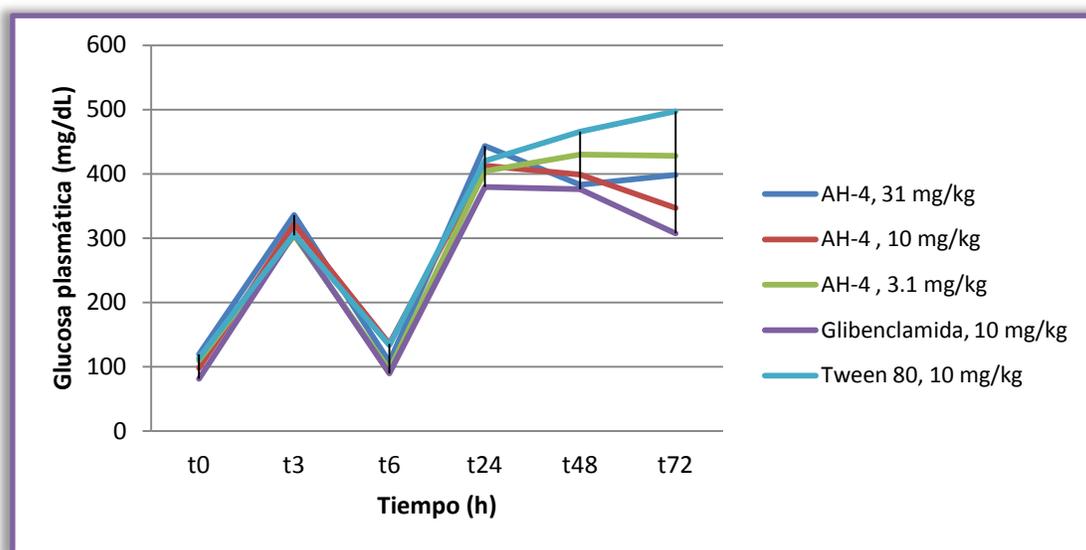
##### 3.6.1.1 Diabetización de ratas a utilizar en la evaluación biológica del compuesto AH-4 obtenido del Exto MeOH de *L. lepideus*.

La inducción de la diabetes fue hecha según lo establecido anteriormente en el punto 2.2.4.1. La glucosa plasmática fue monitoreada en los tiempos: 0, 3, 6, 24, 48 y 72 horas después de la administración de STZ. En la Tabla 23 se muestran los resultados de glucosa plasmática durante el proceso de diabetización de ratas de este grupo; mientras que en la Figura 21 se pueden observar las variaciones de glucosa durante el mismo.

**Tabla 23.** Concentraciones promedio de glucosa plasmática de las ratas sometidas a diabetización para la evaluación del compuesto AH-4. Los valores se expresan en mg/dL.

Compuesto	t <sub>0</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>24</sub>	t <sub>48</sub>	t <sub>72</sub>
AH-4, 31 mg/kg	120	336	108	443	383	398
AH-4, 10 mg/kg	98	322	136	413	399	347
AH-4, 3.1 mg/kg	110	304	95	404	430	428
Glibenclamida, 10 mg/kg	81	307	90	380	376	308
Tween 80, 10 mg/kg	114	306	134	420	466	497

Al igual que en los ensayos biológicos anteriores, las ratas lograron alcanzar una glucosa plasmática superior a los 200 mg/dL después de las 24 h y se mantuvieron con estos valores en los días subsecuentes. Ningún animal murió durante el proceso de diabetización.



**Figura 22.** Variación de glucosa plasmática durante la diabetización de las ratas para la evaluación del compuesto AH-4.

Se puede observar en la Figura 22 que los niveles de glucosa plasmática tuvieron un comportamiento similar a lo obtenido anteriormente tanto en el modelo y su réplica, como en el ensayo de la evaluación del Exto MeOH. Después de las 48 h y al alcanzar más de 200 mg/dL en la glucosa plasmática, las ratas fueron consideradas como diabetizadas. En esta ocasión, ninguna rata murió durante la diabetización o evaluación del compuesto.

La Tabla 24 muestra la variación de peso de las ratas sometidas a diabetización, donde los resultados muestran pocos cambios en la masa corporal de los animales durante el proceso; aunque cabe señalar nuevamente que las ratas disminuyeron la ingesta de alimento e incrementaron la de agua.

**Tabla 24.** Resultados de los valores obtenidos del peso (g) en el proceso de diabetización para la evaluación del compuesto AH-4.

Grupo \ t	t 0	t24	t48	t72	t96
AH-4, 31 mg/kg	217	211	220	221	222
AH-4, 10 mg/kg	205	201	205	204	210
AH-4, 3.1 mg/kg	189	185	192	191	193
Glibenclamida, 10 mg/kg	172	169	169	173	173
Tween 80, 10 mg/kg	232	234	229	228	229

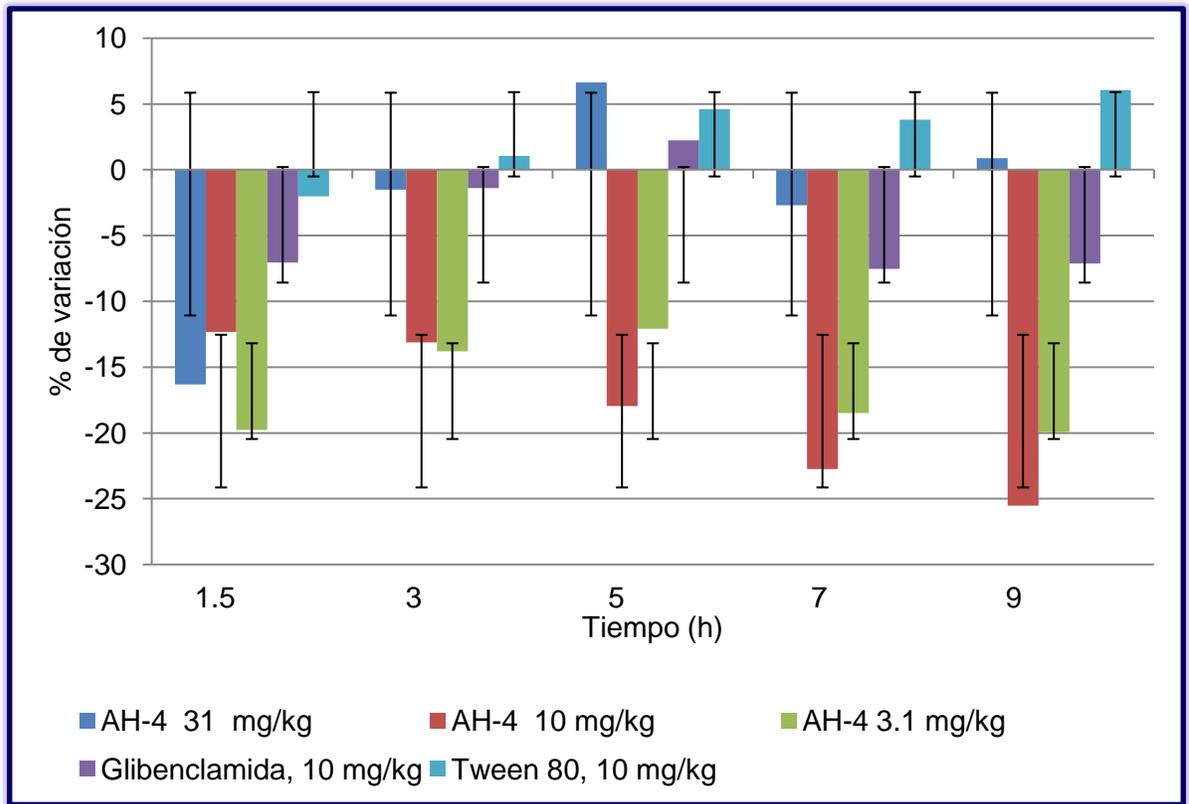
### 3.6.1.2 Evaluación de la actividad antidiabética del compuesto AH-4 obtenido del Exto MeOH de *L. lepideus* en ratas diabetizadas.

Inmediatamente después del proceso de diabetización, se procedió a la evaluación del compuesto AH-4 durante cuatro días. El menor valor de glucosa plasmática obtenido durante las valoraciones, se alcanzó en el día dos y a la dosis de 10 mg/kg. La Tabla 25 muestra los promedios de valores de glucosa plasmática de los grupos de ratas obtenidos durante el mismo día.

**Tabla 25.** Valores de glucosa plasmática (mg/dL) obtenidos en el día dos de evaluación del compuesto AH-4.

<b>Grupo</b>	<b>Evaluaciones</b>	<b>Gluc.</b> <b>t<sub>0h</sub></b>	<b>Gluc.</b> <b>t<sub>9h</sub></b>	<b>Promedio de</b> <b>glucosa/día</b>	<b>% reducción</b> <b>de glucosa</b>
<b>AH-4 (31 mg/kg)</b>		394	301	369	23.60
<b>AH-4 (10 mg/kg)</b>		412	299	342	27.42
<b>AH-4 (3.1 mg/kg)</b>		492	391	421	20.52
<b>Glibenclamida (10 mg/kg)</b>		374	322	345	13.00
<b>Tween 80 (10 mg/kg)</b>		591	479	499	2.44

Se puede observar que el compuesto AH-4 exhibió buenos valores de reducción de glucosa plasmática debido a que los promedios expresan disminución considerable de la glucosa para las tres dosis evaluadas en comparación con los controles. Además se demuestra un efecto hipoglucemiante de larga duración, al lograr la reducción de los valores de glucosa plasmática a las 9 horas de administrado el compuesto. Finalmente el resultado de la reducción glucosa plasmática obtenido de la dosis de 10 mg/kg fue de 27.3%; mientras que para la misma hora y a la misma concentración de glibenclamida fue de 13%, por lo que se puede asumir que el compuesto AH-4 tiene un efecto de reducción de glucosa plasmática bueno. La variación de la glucosa durante el día de evaluación se muestra en la Figura 23.



**Figura 23.** Variaciones de las concentraciones de glucosa (mg/dL) de los grupos de ratas evaluados durante el segundo día con AH-4 en ratas diabetizadas.

### 3.6.2 Evaluación de la actividad antidiabética del compuesto AH-4 obtenido del Exto MeOH de *L. lepideus* en ratas normoglucémicas

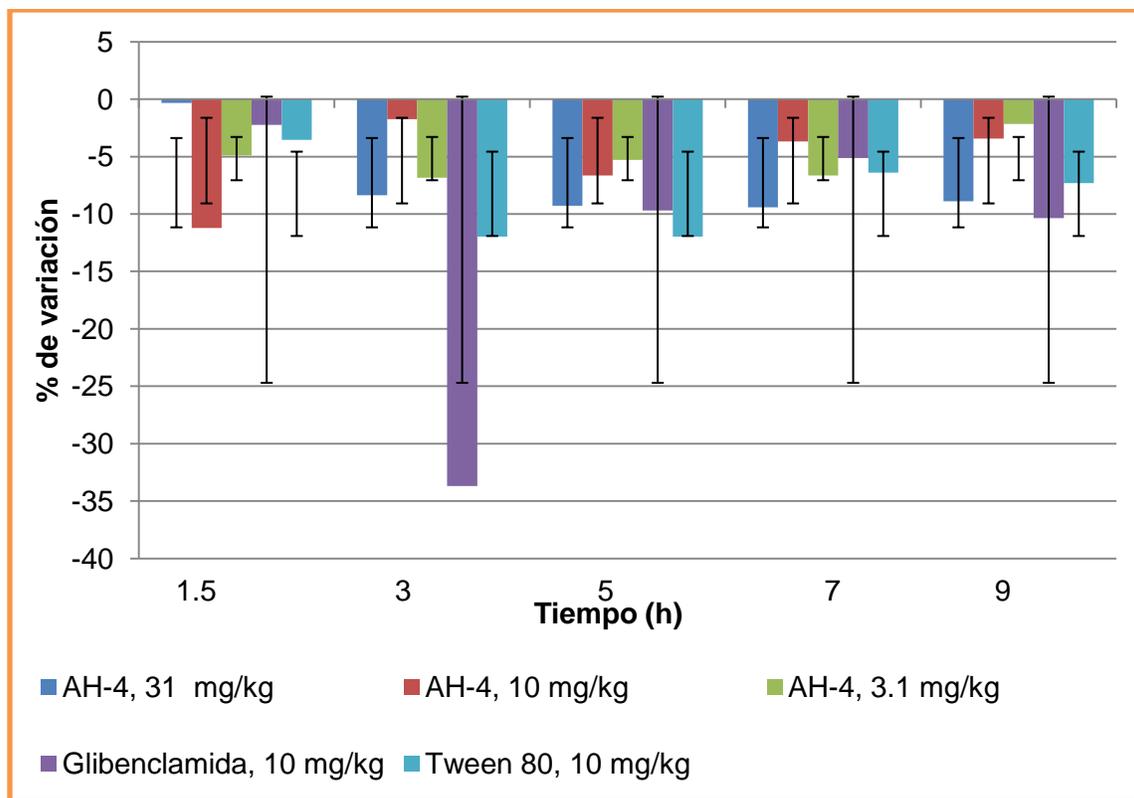
Esta evaluación se efectuó con una población animal de cuatro ratas por grupo evaluado y de forma similar a lo realizado en los puntos 2.2.4.1, 3.4.2 y 3.6.1.2. Los valores de los promedios de la glucosa plasmática obtenidos se muestran en la Tabla 26. Al igual que el grupo anterior, no hubo decesos de animales en esta parte de trabajo.

**Tabla 26.** Valores de glucosa plasmática (mg/dL) obtenidos en el día dos de evaluación del compuesto AH-4.

<b>Grupo</b>	<b>Evaluaciones</b>	<b>Gluc.</b> <b>t<sub>0h</sub></b>	<b>Gluc.</b> <b>t<sub>9h</sub></b>	<b>% de</b> <b>glucosa</b> <b>/ día</b>	<b>% reducción</b> <b>de glucosa</b>
	<b>AH-4, 31 mg/kg</b>	121	108	112	10.74
	<b>AH-4, 10 mg/kg</b>	118	105	115	11.01
	<b>AH-4, 3.1 mg/kg</b>	126	119	120	5.55
	<b>Glibenclamida 10 mg/kg</b>	95	63	85	33.68
	<b>Tween 80 10 mg/kg</b>	109	106	102	2.75

Estos resultados muestran que el compuesto AH-4 no tiene actividad hipoglucemiante en ratas normoglucémicas, debido a que redujo muy ligeramente los niveles de glucosa en las ratas en todas las concentraciones evaluadas, comparadas con el control positivo, la glibenclamida. Sin embargo, conforme avanzó la evaluación, las ratas disminuyeron paulatinamente la glucosa plasmática en comparación con la que fue tomada al tiempo cero con el tiempo final de cada día.

En la Figura 24 se muestran los porcentajes de variación de la glucosa plasmática a lo largo de la evaluación del ensayo biológico.



**Figura 24.** Variaciones de las concentraciones de glucosa (mg/dL) de los grupos de ratas evaluados durante el segundo día con AH-4 en ratas normoglucémicas.

Según los resultados, se corroboró que el compuesto AH-4 tiene un efecto nulo como agente hipoglucemiante al no reducir de forma importante los niveles de glucosa plasmática, en especial al compararlo con la glibenclamida. Cabe señalar que en ambas evaluaciones, los valores de glucosa plasmática y de peso, presentaron la tendencia a disminuir y mejorar a lo largo de los días de la evaluación.

### 3.8 Ensayo enzimático de inhibición de alfa-glucosidasa del Exto MeOH de, de *L. lepideus*, y de los compuestos AH-2, AH-4 y AH-5.

La actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa del Exto MeOH fue buena, en particular a 100  $\mu\text{g/mL}$ ; el compuesto AH-4 resultó en un porcentaje de inhibición alto, mostrándose una inhibición de más de 90% para las tres distintas concentraciones evaluadas, como se muestra en la Tabla 27:

**Tabla 27** Resultados obtenidos del ensayo de inhibición enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa de los compuestos evaluados.

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	D. O. 405 nm	Inhibición (%)
<b>Glucosidasa 100%</b>	-	0.435	-
<i>L. lepideus</i>	1	1.940	-2.21
<i>L. lepideus</i>	10	1.074	43.41
<i>L. lepideus</i>	100	0.102	94.61
<b>AH-2</b>	1	1.757	5.383
<b>AH-2</b>	10	1.796	3.319
<b>AH-2</b>	100	1.533	17.441
<b>AH-4</b>	1	0.001	99.99
<b>AH-4</b>	10	-0.069	100.69
<b>AH-4</b>	100	0.925	90.75
<b>AH-5</b>	1	1.881	-1.291
<b>AH-5</b>	10	1.689	9.079
<b>AH-5</b>	100	1.662	10.497

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

Desde hace miles de años, los basidiomicetos han sido utilizados con fines terapéuticos dentro de culturas ancestrales, como las orientales y algunas otras que se desarrollaron en el territorio mexicano, como la Olmeca y la Azteca. Gracias a ellos, se tiene el conocimiento empírico de que los basidiomicetos podían ser utilizados con fines medicinales para combatir distintas enfermedades.

La importancia de la evaluación de los basidiomicetos radica en que se ha demostrado la eficacia terapéutica de estos sobre distintas enfermedades y desórdenes metabólicos, debido a que pueden actuar sobre distintos órganos y tejidos blanco del organismo, al trabajar con receptores de superficie celulares y desencadenar señales que dan como resultado una respuesta farmacológica.

Además, los metabolitos fúngicos se pueden obtener de diversas formas a partir de los basidiomicetos, ya sea que se cultiven de manera silvestre o en laboratorio, a partir de micelio, cuerpos fructíferos o bien, a partir del medio de cultivo donde crezcan los mismos <sup>53</sup>.

Y, aunque ya se tiene conocimiento de que los macromicetos tienen actividades farmacológicas comprobadas, como antioxidativas, hipoglucémicas, antihiper glucémicas, antitumorales, inmunomoduladoras, hipocolesterolémicas, antihipercolesterolémicas, antimicrobianas, por mencionar solo algunas de ellas, aún no se le ha dado la justa investigación a los basidiomicetos de la región como potenciales agentes terapéuticos. En Oriente, es donde se encuentra desarrollado más ampliamente el estudio de los basidiomicetos; mientras que en México, los reportes de las actividades farmacológicas de los mismos son escasos y la mayoría de ellos no incluyen un aislamiento de los compuestos responsables de dicha actividad, hasta el momento.

En el presente estudio, se evaluó la actividad farmacológica de *Lentinus lepideus* como agente antidiabético, al cual se le realizaron pruebas biológicas como antihiper glucemiante e hipoglucemiante, mediante ensayos en ratas macho *Wistar* normoglucémicas y diabetizadas con STZ. Esta variedad de *Lentinus* cuenta con poca información respecto a sus propiedades terapéuticas, a diferencia de *Lentinus edodes*, debido a que solo se tiene conocimiento de su potencial

terapéutico como inmunomodulador, antioxidante, hipocolesterolemiante, antitirosina, además de que mejora la hematopoesis de médula ósea<sup>37, 39, 40, 41, 42, 48, 55, 64</sup>.

El aislamiento de compuestos biológicamente activos a partir de cultivos puros *in vitro* provenientes del micelio de *Lentinus lepideus* da la certeza de que los compuestos aislados provienen de este basidiomiceto, descartando que provengan a su vez, de cualquier otro microorganismo como podría ocurrir si se evaluaran basidiomicetos silvestres.

El medio Melin-Norkrans modificado es el medio de cultivo de elección, pues proporciona las condiciones adecuadas necesarias para un óptimo desarrollo y crecimiento de *Lentinus lepideus*, al contar con los elementos que requiere como C, O, H, N, P, S, Fe y Mg, procedentes de las distintas sales y constituyentes que lo integran<sup>37, 40, 48, 54, 55</sup>.

La variación de glucosa plasmática, descrita en el punto 1.3, se desarrolla en varias etapas debido al avance de la necrosis de las células beta del páncreas. Los resultados del modelo de diabetes establecido dentro de este estudio concuerda con lo previamente reportado en la bibliografía, debido a que el uso de STZ como agente diabetógeno, produjo una diabetes efectiva irreversible a la

dosis única IP de 50 mg/kg de peso de la rata lo cual concuerda con lo reportado por Mora H. *et al* (2009) al evaluar las distintas concentraciones de STZ. También Dong *et al* (2011) evaluó la concentración de 50 mg/kg de STZ con buenos resultados <sup>38, 43, 44, 45, 46</sup>.

Con la evaluación del efecto antidiabético del Exto MeOH en este trabajo, donde se obtuvo una disminución de glucosa plasmática, de 32 % para el grupo de ratas diabetizadas con STZ a las 6 horas de evaluación, quedaron corroborados los resultados del estudio realizado por Tamez de la O *et al* (2013), donde se comprobó el efecto antidiabético de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, al evaluarlos a las 3 y 6 horas de administrado el Exto MeOH de cada basidiomiceto en ratas diabetizadas con aloxana. Los resultados mostraron que, en el caso de *L. lepideus*, el porcentaje de mayor reducción de glucosa plasmática se presentó a las 6 horas, con 35% <sup>40</sup>.

El ergosterol, una de las moléculas aisladas y elucidadas dentro del presente trabajo, es un componente de la membrana celular de los basidiomicetos; su presencia brinda propiedades antimicrobianas. Proviene de la conversión de acetil-CoA a mevalonato, de este a escualeno y finalmente a colesterol o, en este caso, a ergosterol. La metilación del carbono 24 es característica de hongos, plantas y tripanosomátidos. Hasta el momento, no se ha relacionado su presencia con actividades farmacológicas antidiabéticas <sup>21, 22, 29, 30, 32, 33</sup>.

La única molécula reportada con actividad farmacológica comprobada para *Lentinus lepideus* es PG-101, con actividad inmunomoduladora, por lo que el hallazgo de AH-4 como posible responsable de la actividad terapéutica es una de las aportaciones de este trabajo <sup>32, 39, 40, 41, 39, 40, 42</sup>.

Otras de las moléculas reportadas previamente en la literatura para *Lentinus lepideus* son: metil anisato, metil cinamato; además de detectarse la presencia de ácido gálico, ácido clorogénico, vainillina, naringina, naingenina, formononetin y biocanin-A y otros compuestos sulfuros <sup>63, 64</sup>.

Los resultados de la última evaluación biológica realizada en el presente trabajo, donde se utilizó el sólido denominado AH-4, mostró una actividad eficiente como agente terapéutico antihiper glucemiante, al obtenerse resultados de disminución de glucosa mejores a los mostrados por la glibenclamida. En ambas evaluaciones, el mejor resultado se presentó al segundo día de iniciado el ensayo biológico, y donde se obtuvieron valores de reducción de glucosa plasmática, en el caso del grupo de las ratas diabetizadas, para el subgrupo de 10 mg/kg del sólido, de hasta 27%, mientras que en el mismo día y para la misma hora, el de la glibenclamida fue de tan solo 13%. Por otro lado, en el grupo de las ratas normoglucémicas, la reducción de la glucosa plasmática para el grupo al que se le administró la misma dosis de 10 mg/kg, no fue significativa, debido a que la reducción de glucosa fue de apenas 4%, mientras que en el de glibenclamida fue

de 42%, ambos para la misma hora de evaluación. Con esto, queda corroborada su actividad como agente antidiabético con propiedades antihiperoglucemiantes.

La inhibición enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa de *Lentinus lepideus* no ha sido reportada hasta el momento, por lo que los resultados obtenidos del ensayo, donde se logró la inhibición enzimática de más de 90% por parte del Exto MeOH y en especial del compuesto AH-4, son un aporte más logrado en el presente trabajo; estos resultados dan la pauta para continuar hasta lograr la elucidación estructural de este compuesto.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

Con respecto al modelo biológico, ambos grupos de ratas desarrollaron hiperglucemia debido a la acción de la estreptozotocina, mayor a 200 mg/dL a partir de las 48 horas de administrada esta; de modo que fueron consideradas como diabéticas. Se logró conseguir una diabetes no reversible, debido a esto se considera que el modelo biológico pudo ser establecido con éxito.

*Lentinus lepideus* posee actividad biológica como antidiabético, debido a que su Exto MeOH logró disminuir la glucosa plásmática en las ratas diabetizadas con STZ (hasta en 32% respecto al control) y en las ratas normoglucémicas (con una reducción máxima de 37%), por lo que podemos asumir que *Lentinus lepideus* también contiene uno o varios compuestos con actividad antidiabética, corroborando a su vez los resultados que publicaron Tamez de la O y cols.

Por otro lado, los resultados obtenidos de la inhibición enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa para este basidiomiceto, tanto del Exto MeOH como de AH-4, muestran su efectividad como agente antidiabético.

El extracto metanólico de *L. lepideus* contiene diversos compuestos. El ergosterol (AH-5) y el *p*-metoxicinamato de metilo (AH-2) son dos de estos constituyentes, algunos mayoritarios y otros minoritarios. Cabe señalar que una de las estructuras aisladas y posible responsable de las propiedades antihiper glucémicas del extracto, AH-4, se encuentra en proceso de elucidación estructural, debido a la complejidad de las señales obtenidas en los espectros de RMN hasta el momento, a pesar de múltiples intentos por purificarla. La actividad inhibitoria de alfa glucosidasa para este compuesto es muy alta, por lo que es de particular interés seguir trabajando con este sólido hasta lograr su completo aislamiento y elucidación estructural.

El extracto metanólico de *L. lepideus* cuenta con compuestos mayoritarios, como el sólido AH-4, con propiedades antidiabéticas como antihiper glucemiante que obtuvo mejores valores de disminución de glucosa plasmática en ratas diabetizadas con estreptozotocina en comparación con las ratas que fueron tratadas con glibenclamida, demostrando así que la hipótesis planteada al iniciar el trabajo se acepta como verdadera según los resultados obtenidos.

## CAPÍTULO 6

### PERSPECTIVAS

1. Evaluar en cultivos celulares hepáticos, pancreáticos, renales y/o cerebrales el efecto del basidiomiceto sobre el daño ocasionado por la STZ.
2. Elucidar el posible mecanismo de acción del o los compuestos responsables de la actividad antidiabética aislados a partir del extracto metanólico de *Lentinus lepideus*.
3. Continuar con la evaluación de otros basidiomicetos del género de *Lentinus* para conocer si también, además de *Lentinus edodes* y *Lentinus lepideus*, cuentan con actividades antidiabéticas dentro de sus propiedades farmacológicas.
4. Desarrollar más estudios de basidiomicetos encontrados en México, debido a que el país cuenta con una amplia variedad de los mismos.
5. Elucidar la estructura molecular del compuesto AH-4, obtenido a partir del Exto MeOH de *Lentinus lepideus*.

## CAPÍTULO 7

### REFERENCIAS

1. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. México. (2010).
2. Olaiz F., G., Rojas, R., Aguilar S., C. A., Rauda, J., Villalpando, S. "Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. Salud Pública. 49 (3): S331-S337. México. (2007).
3. Centers of Disease Control and Prevention, CDC 24/7: Saving lives, protecting people, saving Money through prevention (CDC). Última actualización y consulta: Febrero 2013. URL: <http://www.cdc.gov/>; <http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/diabetes.html> , <http://www.cdc.gov/diabetes/> , <http://www.cdc.gov/spanish/enfermedades/diabetes.html>
4. American Diabetes Association (ADA). Última actualización: Enero 2013. Consulta: Enero 2013. URL: <http://www.diabetes.org/>, <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes>
5. Dipiro, J.T. Pharmacotherapy. A pathophysiologic approach, 7th Ed., McGraw Hill Medical. (2008).
6. Organización Mundial de la Salud. OMS, Enero. (2013) URL: [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/)
7. Asociación Mexicana de Diabetes (AMD). Última Actualización y Consulta: Febrero 2013. URL: <http://www.amdiabetes.org>
8. Powers, A.C. Diabetes mellitus. En: Kasper DL (ed). Harrison's Principles of Internal Medicine. 16° ed. Estados Unidos de América, Mc. Graw Hill, 2005:2152-2180. (2005).
9. The management of the hyperosmolar hyperglycaemic state (HHS) in adults with diabetes. Joint British Diabetes Societies Inpatient Care Group. (2012).
10. Chaithongdi, N. Subauste, J. S., Koch, C. A., Geraci, S. A. Diagnosis and management of hyperglycemic emergencies. Hormones. 10(4): 250-260. (2011).

11. Secretaría de Salud de México. Programa Nacional de Salud 2007–2012. Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud. 1ª Ed. Secretaría de Salud, México. (2007).
12. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial de la Diabetes. Datos nacionales. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. (2010).
13. INEGI. Perspectiva estadística Nuevo León, diciembre 2012. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. (2012).
14. SSA, Plan Nacional de Salud 2007-2012. (2008). URL: [http://www.innsz.mx/descargas/transparencia/programas\\_sectoriales/Pronasa.pdf](http://www.innsz.mx/descargas/transparencia/programas_sectoriales/Pronasa.pdf)
15. INSP. ENSANUT 2012, Resultados Nacionales. 1ª Edición. (2012). Última actualización: Enero 2013. URL: <http://ensanut.insp.mx/>, <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
16. INSP. Cuentas en diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y obesidad, México 2006. 1ª Ed. México. (2009).
17. ENSANUT. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. INSP, Secretaría de Salud. México. (2012).
18. Bruton, L. *et al.* Goodman and Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. 12a Ed. McGraw Hill Medical. (2011).
19. American Pharmacists Association (APhA). Drug information handbook, a comprehensive resource for all clinicians and healthcare professionals. 19ª Ed. Lexi-Comp 2010-2011. (2010).
20. Goldman, Ausellio. Cecil textbook of medicine. 22<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company. Estados Unidos de América. (2004).
21. Smith, Rowan, Sullivan. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Cancer Research Compaig, University of Strathclyde, Reino Unido. (2002).
22. Sumbali, G., Mehrotra, R. S. Principles of Microbiology. 1ª Ed., 2009. Tata Mc Graw-Hill. (2009).
23. Hobbs, C. Mushrooms, an exploration of tradition, healing and culture. Botanical Press. EEUU. (1995).
24. Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Freire, L., Fan, M., Soccol, C. R., Thomaz S., V., Lacerda, L. G., Da Silva C. F., M. A., Fan, L. Antidiabetic activities of ethanol extract of dry matters of culture broth of *Coriolus versicolor* in submerged culture. Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal. 54 (4): 701–708. Julio–Agosto 2011. Brazil. (2011)
25. Wasser, S. P., Weis, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushroom: a modern perspective. International Journal of Medicinal Mushrooms. 1: 47–50. (1999).

26. Wasser, S. P., Weis, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1: 31–62. Begell House Inc. (1999)
27. Wasser, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 89: 1323–1332. (2011).
28. Kamal P., P., Li, Y. Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. Review. *Functional Foods in Health and Disease*. 4: 161-171. (2011)
29. Lo, H. C. and Wasser, S. P. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: history, current status, future perspectives, and unsolved problems. Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 13(5): 401-426. (2011)
30. Alves, M. J.; Ferreira, I. C. F. R.; Dias, J.; Teixeira, V.; Martins, A.; Pintado, M. A review on antimicrobial activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Review. *Planta Medica*. 78: 1707-1718. (2012)
31. Wasser, S. P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 12(1): 1-16. (2010).
32. Ferreira, I. C. F. R.; Vaz, J. A.; Vasconcelos, M. H.; Martins, A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.- Anti-Cancer Agents*. 10(5): 424-236. (2010).
33. Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., Jülich, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. Review. *eCAM*. 2(3): 285-299. (2005).
34. Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Internat. J. of Antimicrobial Agents*. 17: 71–74. (2001).
35. Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., Takada, K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *Internat. J. of Antimicrobial Agents*. Vol. 11: P. 151–157. (1999).
36. Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., Cheung, P. C. K. Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities. Review. *Food Hydrocolloids*, 25: 196-206. (2011).
37. Garza O., L., Ramírez G., X. S., Garza O., F., Salinas C., M. C., Waskman de Torres., N., Alcaraz C., Y., Torres A. Oscar. Evaluación de la actividad biológica de extractos acuosos de macromicetos del noreste de México. *Ciencia UANL Abril–Junio*. 10(2):164–170. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. (2006).
38. Yang, B. K., Kim, G. N., Jeong, Y. T., Mehta, P., Song, C. H. Hypoglycemic effects of exo-biopolymers produced by five different medicinal mushrooms in STZ-induced diabetic rats. *Micobiology*. 36(1): 45-49. (2008).

39. Ji, M.; Jeon, H.; Jung, H. J.; Kim, B.; Shin, S. S.; Choi, J. J.; Lee, J. K.; Kim, S. Enhancement of repopulation and hematopoiesis of bone marrow cells in irradiated mice by oral administration of PG101, a water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Experimental Biology and Medicine*. 228: 759-766. (2003).
40. Tamez de la O., E. J. Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipercolesterolemizante de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* del Noreste de México. Tesis doctoral UANL. Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, México. (2007).
41. Jung, Y. S., Yang, B. K., Jeong, Y. T., Islam, R., Kim, S. M., Song, C. H. Immunomodulating activities of water-soluble exopolysaccharides obtained from submerged culture of *Lentinus lepideus*. *J. of Microbiol. and Biotech.* 18(8): 1431-1438. (2008).
42. Yoon, K. N., Lee, J. S., Kim, H. Y., Lee, K. R., Shin, P. G., Cheong, J. C., Yoo, Y. B., Alam, N., Ha, T. M., Lee, T. S. Appraisal of antihyperlipidemic activities of *Lentinus lepideus* in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology*. 39(4): 283-289. (2011).
43. Mora H., A. C., Aragón N., D. M., Ospinga G., L. F. Caracterización del estrés oxidativo en ratas *Wistar* diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*. 16(3): 311-319. (2009).
44. Hwang, H. J., Kim, S. W., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, H. O., Kim, H. M., Yun, J. W. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 76: 3069-3080. (2005).
45. Dong, J., Cai, F., Shen, R., Liu, Y. Hypoglycaemic effects and inhibitory effect on intestinal disaccharidases of oat beta-glucan in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Chemistry*. 129: 1066-1071. (2011).
46. Jia, J., Zhang, X., Hu, Y. S., Wu, Y., Wang, Q. Z., Li, N. N., Guo, Q. C., Dong, X. C. Evaluation in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats. *Food Chemistry*. 115: 32-36. (2009).
47. Hasliza, A. H., Noordin, M. M., Goh, Y. M. Effects of exercise and dietary polyunsaturated fatty acid on blood lipid profiles of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34(1): 151-155. (2011).
48. González B., P., Garza O., L., Vera C., L., Salinas C., M. C., Garza O., F., Ramírez G., X. S., Luján R., R. Evaluation of antioxidant, immunomodulating, cytotoxic and antimicrobial properties of different strains of basidiomycetes from Northeastern Mexico. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (17): 1762–1769. (2010).
49. González B., P., Garza O., L., Salinas C., M. C., Vera C., L., Garza O., F., Ramírez G., X., Torres A., O. Actividad antioxidante, antimicrobiana y citotoxicidad de dos especies mexicanas de *Suillus spp.* *Ciencia UANL*, Enero–

- Marzo. 12, 001: 62–70. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. (2009).
50. Han, C., Liu, T. A comparison of hypoglycemic activity of three species of basidiomycetes rich in vanadium. *Biological Trace Elements Residues*. 127: 177–182. Humana Press Inc. (2009).
  51. Ávila B., L., Cahuana H. Cuentas en diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y obesidad, México 2006. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud. México. (2009).
  52. Imagen basidiomiceto, género Amanita. Junio. (2012). [http://www.kalipedia.com/ecologia/tema/basidiomicetos.html?x1=20070417klpcnavid\\_54.Kes&x=20070417klpcnavid\\_58.Kes](http://www.kalipedia.com/ecologia/tema/basidiomicetos.html?x1=20070417klpcnavid_54.Kes&x=20070417klpcnavid_58.Kes)).
  53. Poucheret, P., Fons, F., Rapior, S. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20 year retrospective analysis. *Cryptogamie, Mycologie*. 27(4): 311-333. Associations des Amis des Cryptogames. Francia. (2006).
  54. Riquelme P., C. Estudio del medio de cultivo Melin-Norkrans para el crecimiento del hongo ectomicorrízico *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Rf. Tesis de licenciatura. Univ. De San Sebastián. Concepción, Chile. (2011).
  55. Ramírez G., X. S. Evaluación de citotoxicidad selectiva, estrés oxidativo y efecto inmunomodulador de extractos de macromicetos del noreste de México. Tesis doctoral UANL. Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, México. (2005).
  56. Tamez de la O, E. J., Garza-Ocañas, L., Zanatta-Calderón, M. T., Lujan-Rangel, R., Garza-Ocañas, F., Badillo-Castañeda, C. T., Ramírez G., X. S. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of aqueous and methanolic extracts of *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* and *Ganoderma applanatum*, from Northeastern Mexico, in Wistar rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(11). (2013).
  57. Chen, D. Q., An, J. M., Feng, Y. L., Tian, T., Qin, X. Y., Zhao, Y. Y. Cloud-point extraction combined with liquid chromatography for the determination of ergosterol, a natural product with diuretic activity, in rat plasma, urine, and faeces. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2013: 1-8. (2013).
  58. Kiho, T., Morimoto, H., Sakushima, M., Usui, S., Ukai, S. Polysaccharides in fungi. XXXV. 1) Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biol. Pharm. Bull.* 18(12): 1627-1629. (1995).
  59. Kiho, T., Kobayashi, T., Morimoto, H., Usui, S., Ukai, S., Hirano, K., Aizawa, K., Inakuma, T. Structural features of an anti-diabetic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia*. *Chem. Pharm. Bull.* 48(11): 1793-1795. (2000).
  60. Sun, P., Zhu, Y., Yang, H., Yan, H., Lu, L., Zhang, X., Mao, J. The ligand and base-free Pd-catalyzed oxidative heck reaction of arylboronic acids and olefins. The Royal Society of Chemistry. (2012).

61. Chen, D. Q., An, J. M., Feng, Y. L., Tian, T., Qin, X. Y., Zhao, Y. Y. Cloud-point extraction combined with liquid chromatography for the determination of ergosterol, a natural product with diuretic activity, in rat plasma, urine and faeces. *J. of Analyt. Methods in Chem.* 2013: 1-8. (2013).
62. Aseervatham, J., Palanivelu, S., Panchanadham, S. *Semecarpus anacardium* (Bhallataka) alters the glucose metabolism and energy production in diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* (2011).
63. Eberhardt, G. Investigations on lignin and lignification. XVI. On the mechanism of the biogenesis of *p*-methoxycinnamate and its possible relation to lignification. *J. Am. Chem. Soc.* 78(12): 2831-2835. (1956).
64. Yoon, K. N.; Alam, N.; Lee, K. R.; Shin, P. G.; Cheong, J. C.; Yoo, Y. B.; Lee, T. S. Antioxidant and antityrosinase activities of various extracts from the fruiting bodies of *Lentinus lepideus*. *Molecules.* 16: 2334-2347. (2011).
65. Lee, B. R.; Lee, Y. P.; Kim, D. W.; Song, H. Y.; Yoo, K. Y.; Won, M. H.; Kang, T. C.; Lee, K. J.; Kim, K. H.; Joo, J. H.; Ham, H. J.; Hur, J. H.; Cho, S. W.; Han, K. H.; Lee, K. S.; Park, J.; Eum, W. S.; Choi, S. Y. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes by *Agrocybe chanxingu* polysaccharide. *Mol Cells.* 29(4): 349-354. (2010).

## RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Adriana Estefanía Hernández Pedraza**

**Candidato para el grado de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia**

**Tesis:** AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA OBTENIDOS A PARTIR DE *Lentinus lepideus*.

**Área de estudio:** Ciencias de la Salud.

### **Biografía:**

**Datos personales:** Lugar y fecha de nacimiento: Matehuala, San Luis Potosí, México; el 6 de enero de 1986, tercer hija de Alberto Hernández Rodríguez y Ana Isabel Pedraza Hernández.

**Escolaridad:** Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, en 2011.

**Experiencia profesional:** Servicio Social (enero-agosto 2010) y Prácticas Profesionales (enero-mayo de 2011) en el Depto. De Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, de la U.A.N.L. Prácticas Profesionales en la Clínica 6 UMF (septiembre-noviembre de 2010).