



Universidad Autónoma del  
Estado de Morelos



Facultad de Farmacia

**“Evaluación del efecto antihiper glucémico y  
antidiabético de una mezcla de  
Esculetina/Flavona en modelos experimentales  
*in vivo e in silico*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN FARMACIA

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

**JOSÉ SEBASTIAN SÁNCHEZ TLATELPA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO**

**CODIRECTORA:**

**L.F. DIANA ITZEL ALDANA TORRES**

Cuernavaca, Morelos

2023

*“La persona que ha dejado de aprender, de  
sonreír y de amar, ha dejado de vivir”*

**-Anónimo**



# **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”**



## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por ser mi segunda casa y brindarme la infraestructura necesaria para llevar a cabo mi proyecto.

Al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera, por inspirarme a superarme día con día, por todo el soporte que me brindó a lo largo de mi estadía en el laboratorio 10.

A mis sinodales, el Dr. César Millán Pacheco, por sus magníficas clases con un gran sentido del humor, al Dr. Gabriel Navarrete Vázquez, por las clases más rigurosas y completas de la facultad, al Dr. Luis Durán, un gran compañero del Laboratorio, y al Dr. Julio Almanza, por todo el conocimiento que brinda al Laboratorio 10.

A la M.F. Diana Itzel Aldana Torres, por todas esas horas que dedicó en mi formación, por todo el apoyo brindado desde el inicio de mi proyecto, por todos esos momentos y risas compartidos.

A mi Familia, quien me ha dado con mucho esfuerzo todo lo necesario para enfocarme a mis estudios y no perder el sendero.

A mis compañeros de generación en el L-10, Alexis, Brandon y Yadira, por todo el apoyo mutuo durante el ciclo de especialización.

A todo el laboratorio 10, quienes han sido una gran familia, haciendo siempre muy amena la convivencia dentro y fuera del laboratorio, especialmente a Armando, Wilson, Hugo, Gaona, Julia, Monse y Martín.



# **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”**



## **DEDICATORIAS**

A mi madre, quien ha sido el pilar de mi vida, quien me ha criado, educado e incentivado a ser quien soy hoy en día, la mayor parte de todo lo que tengo y soy es gracias a ella y a su esfuerzo cotidiano por sacarnos adelante, todos mis triunfos serán de ella.

A mi padre, quien me ha apoyado siempre a su manera tan peculiar de ser, por sus valiosos consejos de vida y lecciones que me ha dado.

A mi abuela “Fita”, quien me inculcó desde pequeño el amor a las plantas medicinales, y gran parte de su filosofía de vida.

A mi abuelo Juan, quien ha velado siempre por nosotros, apoyándonos en todos los sentidos de manera desinteresada, por educarnos y guiarnos siempre por el buen camino.

A mi abuela Maricarmen, quien me brindó su apoyo, brindándome las herramientas y el espacio para desarrollar mis actividades escolares.

A mis tíos, Juan, Inés, Luis, Rocío, quienes me han apoyado a mí y a mi madre desde el inicio, siendo un pilar moral importante en mi crianza.

A mis hermanos, Santiago, Gustavo y Alejandro, por todos esos buenos momentos en familia.

A mis amigos del coro Cenzontle de Morelos, mi segundo hogar, con mención especial a Alejandra Mayren, Yoab Esaú, Laura Karina, Alejandro Guerra, Diana González y Diana Duque, por todo su apoyo incondicional, y por animarme a hacer las cosas sin miedo y animarme a creer en mí mismo.



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
1.RESUMEN.....	8
2.INTRODUCCIÓN.....	10
3.ANTECEDENTES.....	12
3.1 Homeostasis de la glucosa.....	12
3.1.1 Páncreas, papel en la homeostasis de la glucosa..	12
3.1.2 Biosíntesis de la insulina.....	14
3.1.3 Secreción de la insulina.....	15
3.1.4 Señalización de la insulina.....	17
3.1.5 Transportadores de glucosa.....	20
3.1.6 Resistencia a la insulina.....	25
3.2 Diabetes.....	26
3.2.1 Clasificación y etiología de la diabetes.....	26
3.2.2 Epidemiología.....	28
3.2.3 Fisiopatología de la DT2.....	31
3.2.4 Diagnóstico de la DT2.....	33
3.2.5 Tratamientos para la DT2 y la prediabetes.....	34
3.3 Antecedentes de la Flavona.....	36
3.4 Antecedentes de la Esculetina.....	37
4.JUSTIFICACIÓN.....	39
5.HIPÓTESIS.....	41
6.OBJETIVOS.....	43



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

6.1 Objetivo General.....	43
6.2 Objetivos Específicos.....	43
7. METODOLOGÍA.....	45
7.1 Reactivo y equipos.....	45
7.2 Animales.....	45
7.3 Determinación del efecto antihiper glucémico.....	45
7.3.1 Curva de tolerancia a la glucosa en ratones C57BL/6 normoglucémicos.....	45
7.3.2 Curva de tolerancia a la sacarosa en ratones C57BL/6 normoglucémicos.....	45
7.4 Determinación del efecto antidiabético.....	46
7.4.1 Modelo de diabetes experimental no Insulinodependiente (DENID).....	46
7.4.2 Ensayo antidiabético agudo.....	47
7.5 Evaluación <i>in silico</i> .....	47
7.5.1 Estudio de acoplamiento molecular biodirigido (Docking Molecular) sobre $\alpha$ -Glucosidasa con Esculetina y Flavona.....	47
7.5.2 Docking Molecular “Ciego” sobre $\alpha$ -Glucosidasa con Esculetina y Flavona.....	48
8. RESULTADOS Y DISCUSION.....	50
8.1 Determinación del efecto antihiper glucémico.....	50
8.1.1 Curva de tolerancia a la glucosa.....	50
8.1.2 Curva de tolerancia a la sacarosa.....	51
8.2 Determinación del efecto antidiabético.....	52
8.3 Evaluación <i>in silico</i> .....	54
9.CONCLUSIONES.....	62
10. PERSPECTIVAS.....	64
11.BIBLIOGRAFIA.....	66



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Páncreas: Parte exocrina y endócrina (pág. 13)
- Figura 2** Biosíntesis de la Insulina (pág. 15)
- Figura 3** Secreción de la Insulina (pág. 17)
- Figura 4** Receptor de Insulina (pág. 18)
- Figura 5** Vías de señalización de la insulina al unirse al Receptor de Insulina (pág. 20)
- Figura 6** Representación de la estructura general de los transportadores SGLT (pág. 22)
- Figura 7** Representación de la estructura general de los transportadores GLUT (pág. 24)
- Figura 8** Topología propuesta de los transportadores SWEET-1 humanos (pág. 24)
- Figura 9** Personas adultas con diabetes en el mundo y por región en 2021, y panorama hacia el 2030 y 2045 (pág. 29)
- Figura 10** Factores involucrados en el desarrollo de DT2 (pág. 32)
- Figura 11** Estructura de la Flavona (pág. 36)
- Figura 12** Estructura de la Esculetina (6,7-Dihydroxicumarina) (pág. 37)
- Figura 13** Acoplamiento de Esculetina y Flavona con la sacarosa-isomaltasa (pág. 55)
- Figura 14** Mapa de interacciones de la Esculetina con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (pág. 56)
- Figura 15** Mapa de interacciones de la Esculetina con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (pág. 57)
- Figura 16** Mapa de interacciones de la Flavona con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (pág. 57)
- Figura 17** Mapa de interacciones de la Flavona con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (pág. 58)
- Figura 18** Modelo propuesto de la interacción de la combinación Esculetina/Flavona con la sacarosa-isomaltasa (pág. 60)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Gráfica 1** Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratones normoglucémicos (pág. 51)

**Gráfica 2** Curva de Tolerancia a la Sacarosa en ratones normoglucémicos (pág. 52)

**Gráfica 3.** Ensayo antidiabético agudo en ratones diabéticos (pág. 54)

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Características funcionales de los SGLT (pág. 21)

**Tabla 2.** Características funcionales de los GLUT (pág. 23)

**Tabla 3.** Factores etiológicos de la diabetes (pág. 27)

**Tabla 4.** Criterios para el diagnóstico de DT2 o pre-diabetes (pág. 33)

**Tabla 5.** Tratamientos farmacológicos para la DT2 (pág. 35)

**Tabla 6.** Resultados del Docking Molecular “Ciego” (pág. 59)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## ABREVIATURAS

<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes (por sus siglas en inglés)
<b>ALAD</b>	Asociación Latino-Americana de Diabetes
<b>CTG</b>	Curva de tolerancia a la Glucosa
<b>CTS</b>	Curva de tolerancia a la Sacarosa
<b>DT2</b>	Diabetes Tipo 2
<b>FIes 1:1m</b>	Combinación Esculetina/Flavona 1:1 molar
<b>GIP</b>	Polipeptido insulínico dependiente de glucosa
<b>GLP-1</b>	Péptido similar al glucagón 1
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>IDF</b>	Federación Internacional de Diabetes (por sus siglas en inglés)
<b>IFG</b>	Glucosa Alterada en Ayuno
<b>IGT</b>	Intolerancia a la Glucosa (por sus siglas en inglés)
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>IR</b>	Receptor de Insulina (por sus siglas en inglés)
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos (por sus siglas en inglés)
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de Salud
<b>PI3K</b>	Fosfatidil inositol 3 quinasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas (por sus siglas en inglés)
<b>RMSD</b>	Error Raíz Cuadrático Medio (por sus siglas en inglés)
<b>SGLT</b>	Transportador de glucosa asociado a sodio
<b>SWEET</b>	Tipo de transportador recientemente descubierto

# **1. RESUMEN**



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

La diabetes es una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por mantener niveles elevados de glucosa en sangre, la más común es la diabetes tipo 2, en la cual, el cuerpo no produce suficiente insulina para mantener la homeostasis de la glucosa o presenta resistencia a ésta (OPS, 2022).

Actualmente México ocupa el séptimo lugar en el ranking mundial de diabetes, además de ser la tercera causa de muerte a nivel nacional, sólo por detrás de los accidentes cerebrovasculares y el COVID-19. (IDF, 2021 ; INEGI 2021).

Desde hace unas décadas se ha venido realizando investigación en torno a los compuestos de tipo flavonoides y cumarinas, ya que presentan diversas actividades farmacológicas, reportando incluso actividad antidiabética (Suren, 2022; Zhao, 2007), por esta razón se decidió evaluar el potencial efecto antidiabético de Esculetina y Flavona, buscando resultados que nos pudieran dar una pista de sus posibles mecanismos de acción.

Con el fin de evaluar su actividad antidiabética, ambos compuestos fueron evaluados en Curvas de Tolerancia a la Sacarosa y a la Glucosa (CTS y CTG), resultando la Esculetina con efecto antihiper glucémico en CTS, potenciando su efecto al ser administrado en combinación con la Flavona, dando indicios de ser inhibidores de  $\alpha$ -Glucosidasa, por lo que se realizaron acoplamientos moleculares sobre esta proteína a fin de sustentar este mecanismo. En el ensayo antidiabético agudo se pudo observar una significativa reducción en los niveles de glucemia en ratones tras la administración de Esculetina y Flavona por separado, incluso más allá de los niveles obtenidos tras la administración de Glibenclamida a la hora 7. Estos resultados dan sustento a una probable actividad de mecanismos insulinosensibilizadores diferentes por parte de ambos compuestos, ya que en dosis menores (en combinación) perdieron dicha actividad. (Gúzman, 2015; Cerón, 2016),



**“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”**



## **2. INTRODUCCIÓN**



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

La diabetes es una de las enfermedades no transmisibles de mayor crecimiento en el siglo XXI, la cual ha alcanzado niveles alarmantes. Se trata de una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por una incapacidad del organismo de mantener una adecuada concentración de glucosa en sangre, debido a diversos factores, entre los que destacan una deficiencia en la secreción de insulina y/o una inadecuada utilización de esta hormona por el organismo. **(OMS, 2021).**

En el 2021, la Federación Internacional de Diabetes (IDF), estimó que en México existían 14.1 millones de personas mayores de 20 años con diabetes, ocupando así el séptimo lugar en el ranking de países con mayor número de enfermos de diabetes mayores a 20 años, por debajo de países como China, India, Pakistán, Estados Unidos, Indonesia y Brasil. Sin embargo, la diabetes en México tiene una prevalencia del 16.5% de adultos mayores a 20 años, convirtiéndolo así en el país con más alta prevalencia en todo América y el Caribe. **(IDF, 2021).**

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la diabetes fue en el 2020 la tercera causa de decesos en el territorio nacional, correspondiente al 14% del total de fallecimientos en México, solamente por detrás de enfermedades del corazón (20.2%) y de la COVID-19 (18.5%); teniendo así una tasa de mortalidad de 11.95 por cada 10mil habitantes, la cifra más alta en los últimos años con tendencia a la alta. **(INEGI, 2021).**

A consecuencia de lo anterior, este trabajo de investigación se enfoca en el estudio del efecto antidiabético de la Flavona y la Esculetina (6,7, dihidroxicumarina) por separado y en combinación 1:1 molar, con el fin de generar conocimiento acerca de su potencial como moléculas base para el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos.

# **3. ANTECEDENTES**



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 3.1. Homeostasis de la glucosa

La glucosa es una de las moléculas más importantes en el organismo, ya que a partir de ella se genera la energía necesaria para el correcto funcionamiento celular en todo el cuerpo, y a pesar de que existen rutas metabólicas para la síntesis endógena de esta vital molécula, la mayor parte se adquiere por medio de la dieta, por lo que su concentración está mediada por la acción de diversas hormonas como la insulina, el glucagón, el cortisol, entre otras; para mantener una relación entre su gasto y su concentración en sangre.

El mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, se denomina *Tolerancia a la glucosa*. (Brunton, L., 2019)

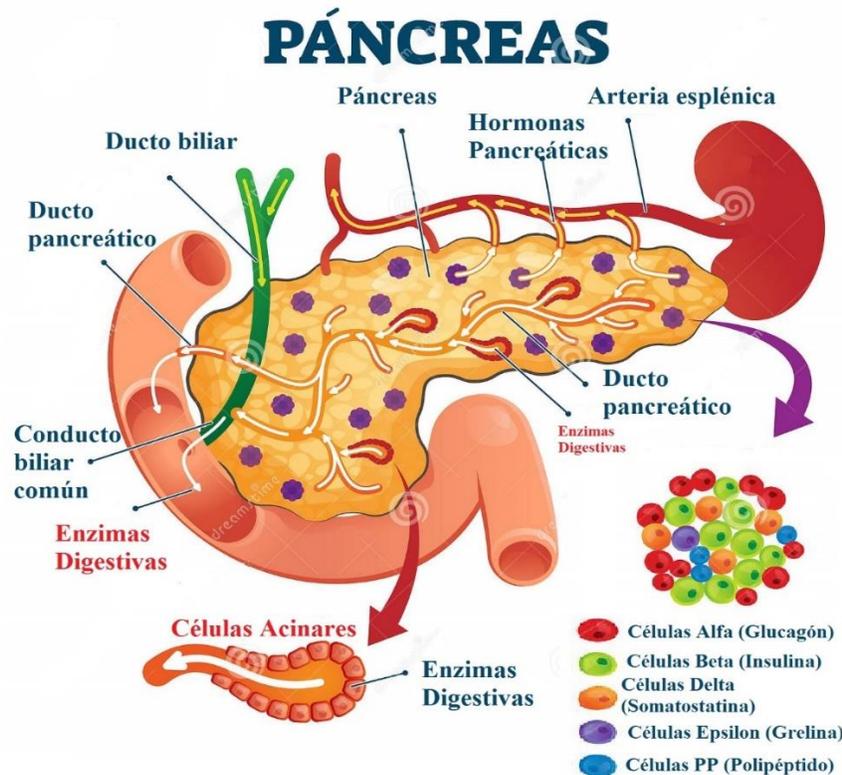
### 3.1.1 Páncreas, papel en la homeostasis de la glucosa

El páncreas (Figura 1) es un órgano que se puede dividir en dos partes fundamentales, la parte exocrina, la cual constituye alrededor del 98% del páncreas, encargada de la síntesis de enzimas gástricas para la digestión de lípidos y grasas, y la parte endócrina (2%), la cual contiene los llamados islotes de Langerhans, constituidos primordialmente por 5 tipos de células:

- Células  $\alpha$ : Secretan Glucagón
- Células  $\beta$ : Secretan Insulina
- Células  $\delta$ : Secretan Somatostatina
- Células PP: Secretan Polipéptido pancreático
- Células  $\epsilon$ : Secretan Grelina



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



**Figura 1.** Páncreas: Parte exócrina y endócrina (Modificado de <https://es.dreamstime.com/modelo-de-seccion-transversal-anatomica-del-pancreas-ejemplo-midico-ilustracion-vectorial-proceso-flujo-sanguineo-estructura-image169963066>)

Es en las células beta del páncreas dónde se lleva a cabo la síntesis de la insulina, controlada principalmente por las concentraciones de glucosa en sangre, y en menor medida por otros estímulos, como lo son las incretinas (*GIP* y *GLP-1*), hormonas insulínótropas liberadas por el tracto gastrointestinal en proporción a la cantidad de nutrientes ingeridos, aunque todos estos estímulos son relativamente ineficaces cuando la glucosa plasmática está en niveles basales (80-100mg/dL).

(Brunton, L., 2019)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 3.1.2. Biosíntesis de la insulina

La síntesis de la insulina comienza dentro de los ribosomas pertenecientes al retículo endoplásmico rugoso ubicados en las células beta-pancreáticas, donde se sintetiza como preproinsulina, una cadena de 110 aminoácidos con 4 cadenas polipeptídicas, las cuales son:

- Cadena SP (*Signal peptide*) de 24 aminoácidos
- Cadena B de 30 aminoácidos
- Cadena C de 31 aminoácidos
- Cadena A de 21 aminoácidos

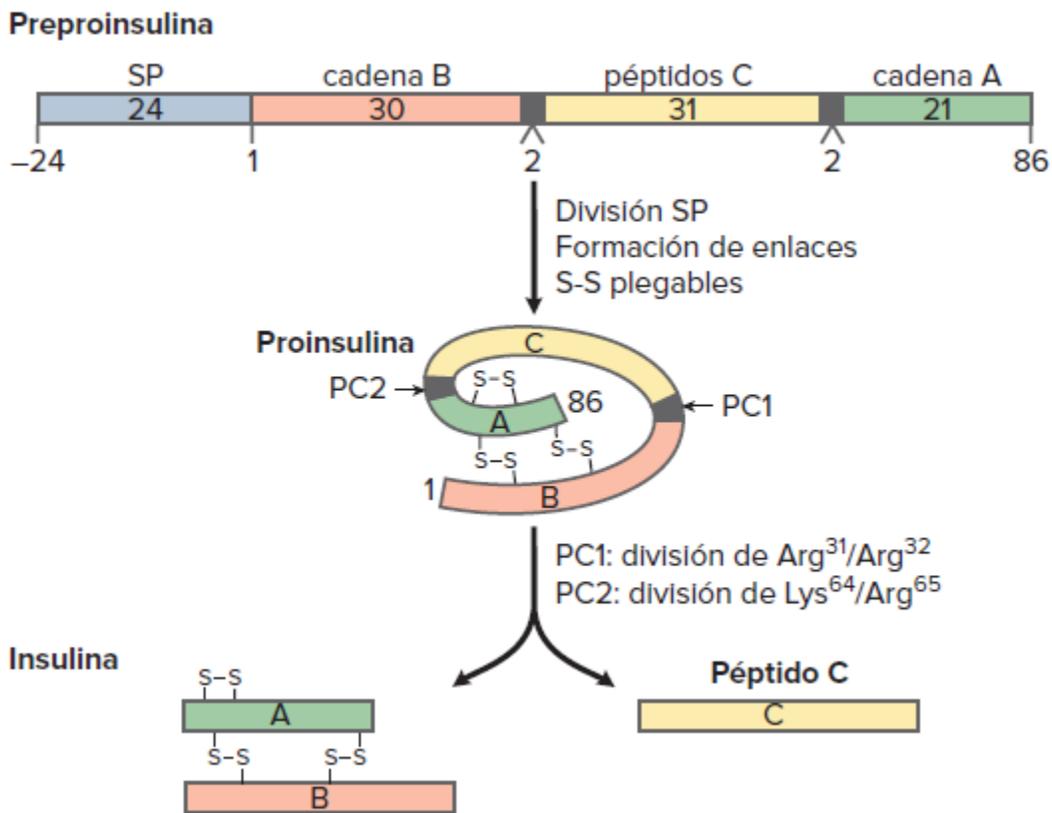
Adicional a ellas se encuentran 2 uniones pequeñas que constan de 2 aminoácidos, entre las cadenas B-C (Arg<sup>31</sup>/Arg<sup>32</sup>) y las cadenas A-C (Lys<sup>64</sup>/Arg<sup>65</sup>), los cuales actúan como sitios de acción para las endopeptidasas PC1 y PC2 (**Brunton, L., 2019**).

Una vez obtenida la preproinsulina, una peptidasa escinde la cadena SP, generado así la proinsulina, la cual efectúa un plegamiento que deja alineados los puentes disulfuro entre las cadenas A y B. Posteriormente, la proinsulina viaja hasta el aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción, los cuales deben madurar, y durante este lapso actúan dos endopeptidasas (PC1 y PC2), las cuales rompen a la prohormona, dejando así la cadena A y B (Insulina), liberando la cadena C (péptido C). (**Figura 2**).

En el interior del gránulo, la insulina cristaliza con ayuda de Zinc en hexámeros, dejando al péptido C libre, listos para ser secretados por las células  $\beta$  mediante exocitosis. (**Brandan, N., 2011**)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



**Figura 2.** Biosíntesis de la Insulina  
(Tomado de: Brunton, L., 2019)

### 3.1.3. Secreción de la Insulina

Para la secreción de la Insulina intervienen diversos factores, ya que ésta es modulada por diversas señales generadas por nutrientes, neurotransmisores y hormonas. Por la parte de los nutrientes, es la glucosa misma quien es el principal regulador fisiológico para la secreción de insulina. (Brandan, N., 2011)

Para dicho proceso, la glucosa entra a las células beta pancreáticas mediante un transportador de glucosa, denominado **GLUT2**, esto debido a la naturaleza polar de la glucosa y a su incapacidad de atravesar la membrana lipídica por sí sola. La



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

entrada de glucosa a las células beta pancreáticas mediante **GLUT2** es rápida, una vez dentro de la célula, la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato mediante una glucoquinasa, siendo esta molécula el paso inicial del metabolismo de la glucosa, dando como resultado la producción de **ATP**. Como consecuencia del incremento de ATP/ADP, se cierran los canales de potasio dependientes de ATP, dejando una acumulación de iones potasio, produciendo la despolarización de la membrana celular, ocasionando una apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, siendo la entrada de dicho catión, el estímulo para la secreción de insulina al medio extracelular (Figura 3). (Cerón, L., 2016)

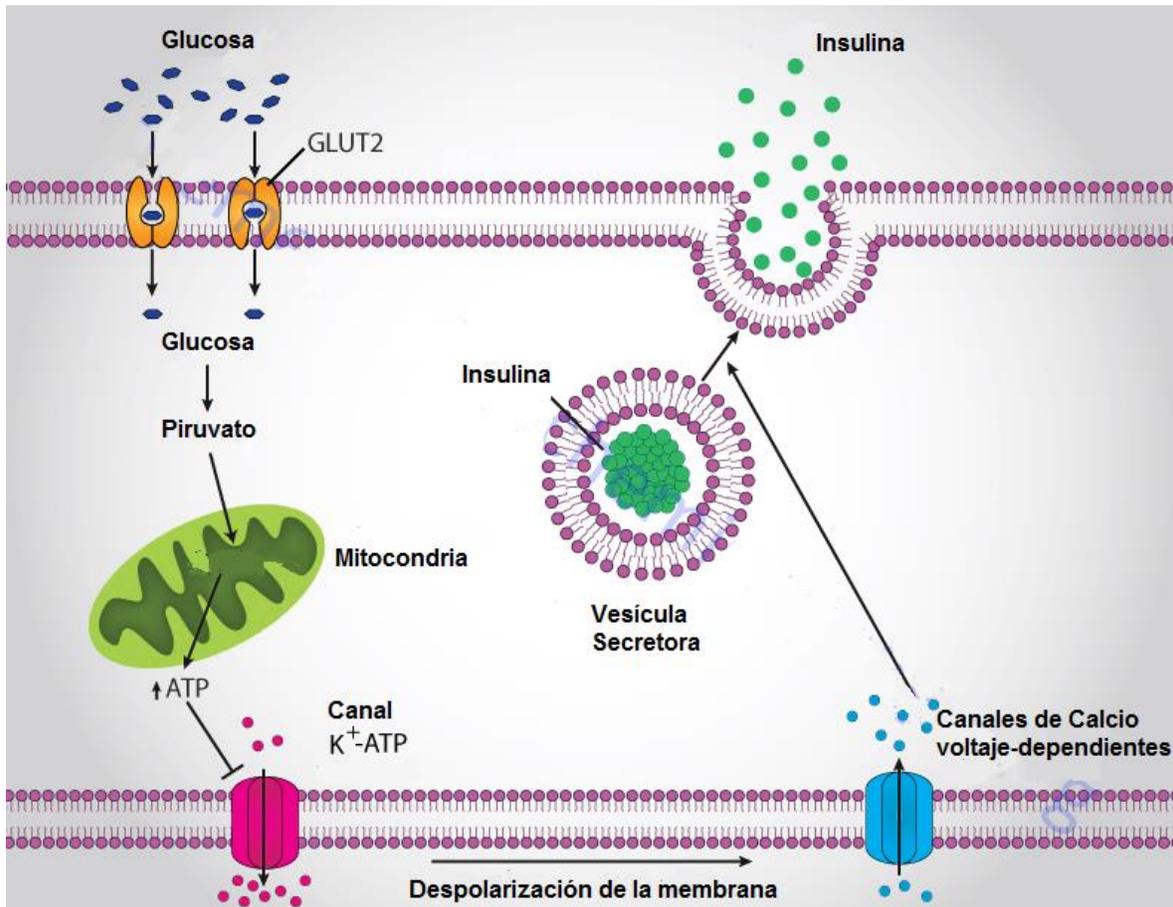
La secreción de insulina mediada por glucosa consiste en 2 fases, una rápida, de la cual se vale la liberación de los gránulos maduros almacenados, y una segunda fase en donde, si es persistente la estimulación por glucosa, se libera la insulina de nueva síntesis. Otros nutrientes capaces de estimular la secreción de insulina (en ausencia de glucosa), son los aminoácidos. (Brandan, N., 2011)

A su vez, también existen algunas hormonas que tienen un impacto directo sobre la secreción de insulina, como lo son las incretinas: GLP-1 (secretados por las células L del íleon) y el GIP (secretado por las células K del duodeno y el yeyuno), las cuales son secretadas en proporción a los nutrientes ingeridos, estimulando así la síntesis y secreción de insulina. En cuanto a los neurotransmisores, la somatostatina es un potente inhibidor de la liberación de la insulina, sin embargo, no influye en la biosíntesis de ésta.

(Brandan, N., 2011)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



**Figura 3.** Secreción de la Insulina

(Modificado de: The Biomedical Biochemistry 2022 en línea:

<https://themedicalbiochemistrypage.org/insulin-function-insulin-resistance-and-food-intake-control-of-secretion/>)

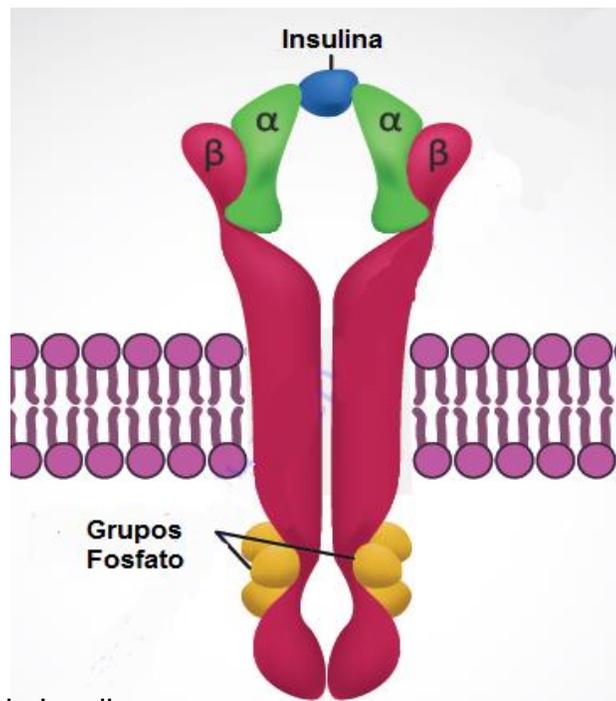
### 3.1.4. Señalización de la Insulina

Los receptores de insulina (**IR**) se encuentran en casi cualquier tipo de célula de mamíferos, y las acciones que lleva a cabo la insulina en dichas células son de tipo anabólica, promoviendo la captura, el uso, la utilización y el almacenamiento de los nutrientes principales: glucosa, lípidos y aminoácidos, promoviendo la glucogénesis, lipogénesis y síntesis proteica, inhibiendo así el catabolismo de estas mismas. (Brunton, L., 2019).



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Estos IR (Figura 4) son glucoproteínas transmembranales de la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de quinasas de tirosina, y está compuesto por un dímero de 2 subunidades, las  $\alpha$  (localizadas en el exterior de la membrana plasmática) y las  $\beta$  (transmembranales), conectadas mediante puentes disulfuro.



**Figura 4.** Receptor de Insulina

(Modificado de: The Biomedical Biochemistry 2022 en línea:

<https://themedicalbiochemistrypage.org/insulin-function-insulin-resistance-and-food-intake-control-of-secretion/>)

La actividad de la insulina en su receptor consta de un cambio conformacional de las subunidades  $\alpha$ , ya que estas inhiben la inherente actividad tirosina cinasa de las subunidades  $\beta$ , y al existir este cambio conformacional permite la transfosforilación entre las subunidades  $\beta$ , produciéndose así una autofosforilación del receptor en sitios específicos que van desde la región yuxtamembranal hasta la cola intracelular del receptor. La activación del receptor de insulina da lugar a la señalización mediante la fosforilación de un conjunto de proteínas intracelulares, las cuales



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

interactúan con los efectores que amplifican y extienden la cascada de señalización, esto da inicio por dos principales vías: La vía principal, fosfatidilinositol 3 quinasa (**PI3K**), y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (**MAPK**) (**Olivares et al., 2008**)

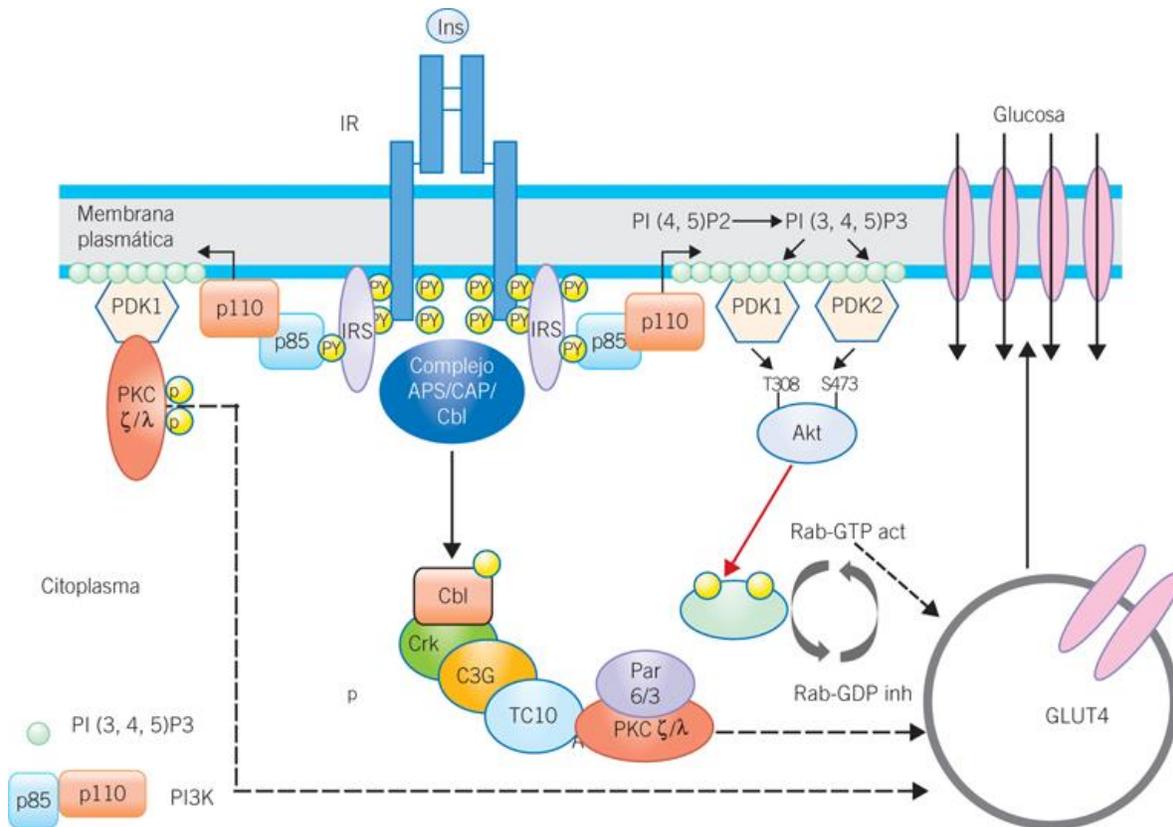
Para la vía PI3K, se debe activar el receptor IR mediante la insulina, desencadenando su fosforilación en los residuos de tirosina, activando el sustrato del receptor de insulina (**IRS**), dicho sustrato posee varios sitios de fosforilación de residuos de tirosina (sitios de unión) y activación de proteínas que contienen dominios SH2, como lo es PI3K, que consta de una subunidad reguladora (p85) la cual interacciona con IRS-1, ocasionando la activación de la subunidad catalítica (p110); una vez activada p110, ésta tiene acceso a su sustrato el fosfatidilinositol 4,5-difosfato, o **PI(4,5)P2**, y lo fosforila en la posición 3 del inositol, dando como resultado fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato o **PI(3,4,5)P3**, ambos localizados en la membrana plasmática, PIP3 es el sitio de unión de otras enzimas, como lo son las cinasas de serina dependientes de fosfatidilinositol (**PDK**) 1 o 2.

El complejo proteico de PDK2 activa a la proteína cinasa B (**PKB**, también llamada **Akt**), induciendo una primera fosforilación en la Ser<sup>437</sup>, seguida de una fosforilación en la Thr<sup>308</sup> con ayuda de PDK1; una vez activada Akt, esta fosforila a **AS160** (una proteína la cual regula negativamente las proteínas G pequeñas Rab) inactivándola, por lo que permite que se dé el tráfico dependiente de Rab-GTP de GLUT-4 hacia la membrana plasmática, translocando a dichos transportadores, importantes para el ingreso de la glucosa a la célula (Figura 5)

Por otra parte, PDK1 también puede actuar por otra vía, ya que este a su vez puede fosforilar a dos formas atípicas de la Proteína Cinasa C (**PKC**), contribuyendo así a la translocación de GLUT-4 a la membrana. (**Gutiérrez et al., 2017**)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



**Figura 5.** Vías de señalización de la insulina al unirse al Receptor de Insulina (Tomado de: Bases moleculares de la diabetes mellitus: <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1473&sectionid=102744767#11118680631>)

### 3.1.5. Transportadores de glucosa

La entrada de glucosa a la célula requiere de transportadores, debido a que su naturaleza polar no permite su entrada por difusión simple. Existen tres tipos de transportadores de glucosa; los transportadores de glucosa asociados a sodio (**SGLT**), que se valen del transporte de sodio; los facilitadores del transporte de glucosa (**GLUT**), que constituyen el principal mecanismo de entrada de glucosa a la célula; y los transportadores dulces (**SWEET**), recientemente descritos en plantas y bacterias, identificándose un homólogo en humanos. (Millán, 2015).



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Existen 6 formas descritas para los SGLT, localizados principalmente en el intestino delgado y riñones, siendo su tarea principal la absorción y reabsorción de nutrientes. Los SGLT son un sistema simporte que aprovecha el transporte de Na<sup>+</sup> para introducir glucosa a la célula; proceso impulsado por la acción de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, (llamada también ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, por usar **ATP** como fuente de energía).

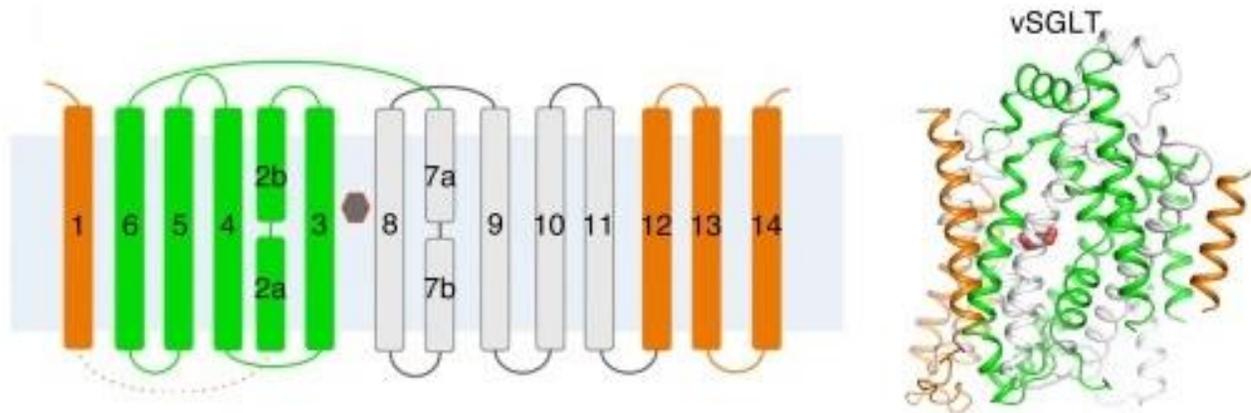
**Tabla 1.** Características funcionales de los SGLT (Machado *et al.*, 2019)

Características funcionales de los SGLT		
Transportador	Transporta	Localización tisular
SGLT-1	Una glucosa o galactosa con 2 iones Na <sup>+</sup> .	Intestino delgado (íleon) y riñones (túbulo contorneado proximal, y células epiteliales del ribete en cepillo).
SGLT-2	Una glucosa con un ion Na <sup>+</sup> .	Riñón (túbulo contorneado proximal) y en menor medida en el íleon.
SGLT-3	Una glucosa con 2 iones Na <sup>+</sup> .	Neuronas colinérgicas, uniones neuromusculares .
SGLT-4	Una glucosa con un ion Na <sup>+</sup> , en el intestino, se cree que es capaz de transportar todos los monosacáridos.	Intestino, riñón(epitelio tubular), hígado, cerebro, pulmón, tráquea, útero y placenta.
SGLT-5	Glucosa o manosa con un ion Na <sup>+</sup> .	Intestino delgado y riñón.
SGLT-6	Una glucosa o galactosa por 2 iones Na <sup>+</sup> .	Cerebro, riñón, médula espinal e intestino delgado.



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

La estructura base de los SGLT consta de 14 dominios transmembranales y sus sitios amino y carboxilo terminal fuera de la célula (Figura 6).



**Figura 6.** Representación de la estructura general de los transportadores SGLT. Estructura del transportador SGLT, con su sustrato (Galactosa) representada con el hexágono gris, las estructuras verdes y blancas son las hélices transmembranales repetidas del SGLT, mientras que las estructuras naranjas representan las hélices transmembranales adicionales. (Tomado de: GLUT, SGLT and SWEET: Structural and mechanistic investigation of the glucose transporters: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815417/>)

Por otra parte, para la familia de los GLUT, existen 14 formas descritas hasta la fecha, se trata de sistemas uniporte a favor del gradiente de concentración con excepción de GLUT-13, y son de difusión facilitada, presentes en casi todas las células del cuerpo. De esta familia, los más importantes son los GLUT-2 y GLUT-4, ya que el GLUT-2 funciona como sensor para la excreción de insulina y el GLUT-4 funciona como intermediario al paso de glucosa al interior de células musculares, cardíacas y adipocitos, mediante su traslocación en forma de vesículas hacia la membrana plasmática resultado de la señalización de la insulina.



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

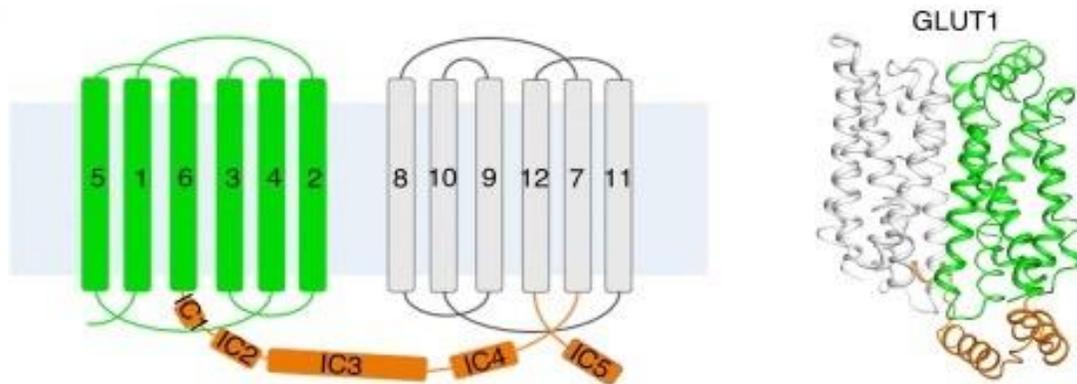
**Tabla 2.** Características funcionales de los GLUT (Machado *et al.*, 2019)

Características funcionales de los GLUT		
Transportador	Transporta	Localización tisular
GLUT-1	Glucosa y galactosa.	Eritrocitos, barrera hematoencefálica, cerebro, placenta y riñón.
GLUT-2	Glucosa.	Hepatocitos, células $\beta$ -pancreáticas, intestino delgado y riñón.
GLUT-3	Glucosa, galactosa, manosa, maltosa, xilosa .	Cerebro, placenta, testículos, músculo esquelético.
GLUT-4	Glucosa.	Músculo esquelético, cardiaco y tejido adiposo.
GLUT-5	Fructosa.	Intestino delgado (Yeyuno), testículo, riñón, cerebro, músculo y tejido adiposo.
GLUT-6	Glucosa.	Cerebro, leucocitos y bazo.
GLUT-7	Glucosa y fructosa.	Testículos, próstata, intestino delgado y colon.
GLUT-8	Glucosa y fructosa.	Hígado, corazón, testículos, intestino, tejido adiposo, cerebro, blastocito.
GLUT-9	Fructosa y uratos.	Riñón, hígado, intestino delgado, leucocitos y placenta.
GLUT-10	Glucosa y galactosa.	Hígado, páncreas, pulmón, corazón, músculo esquelético, cerebro, placenta y riñón.
GLUT-11	Glucosa y fructosa.	Corazón, músculo esquelético, riñón, placenta, tejido adiposo y en el páncreas.
GLUT-12	Glucosa.	Musculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado, próstata, placenta, glándula mamaria, riñón y cerebro.
GLUT-13	Mioinocitol acoplado a H <sup>+</sup>	Cerebro (hipocampo, cerebelo, y tallo cerebral).
GLUT-14	Glucosa.	Testículo y células del SNC.

En cuanto a su estructura, los GLUT poseen 12 dominios transmembranales y los sitios amino y carboxilo terminal se encuentran al interior de la célula (Figura 7) (Machado *et al.*, 2019)

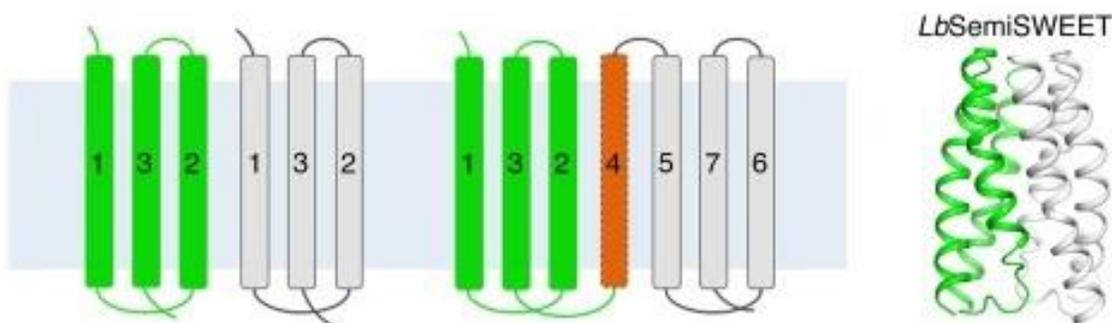


# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



**Figura 7.** Representación de la estructura general de los transportadores GLUT. Estructura general de los transportadores GLUT, en color verde se representan las hélices correspondientes al sitio N-terminal y en blanco al sitio C-terminal, en color naranja están representados los sitios intracelulares. (Tomado de: GLUT, SGLT and SWEET: Structural and mechanistic investigation of the glucose transporters: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815417/>)

Por último, están los recién descritos transportadores SWEET, los cuales se expresan en el epidídimo de los testículos, enterocitos, hepatocitos y en las glándulas mamarias, se describe que SWEET-1 suministra glucosa para la síntesis de lactosa en la glándula mamaria, y se trata de un dímero de tres sitios transmembranales (Figura 8). (DENG, 2016)



**Figura 8.** Topología propuesta de los transportadores SWEET-1 humanos. La figura de la izquierda representa la topología propuesta para los transportadores SWEET-1 presente en humanos, dímeros con un patrón 1-3-2 en su arreglo espacial, mientras que del lado derecho se encuentran los transportadores SWEET presentes en *Leptospira biflexa* (Tomado de: GLUT, SGLT and SWEET: Structural and mechanistic investigation of the glucose transporters: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815417/>)



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

### 3.1.6. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es un estado patológico de las células, donde existe una respuesta inadecuada o insuficiente a la insulina en tejidos de amplia distribución en el cuerpo, como lo son el tejido muscular esquelético y el tejido adiposo, que trae como consecuencia un aumento en los niveles basales de glucosa en sangre. Dicho padecimiento puede tener diversas causas, y se puede considerar que es un factor importante para el desarrollo de diabetes tipo 2. Entre sus posibles causas están:

- Alteraciones pre-receptor: Son todos aquellos factores fuera de la célula, como lo puede ser la presencia de anticuerpos antiinsulina, mutaciones que afecten en la síntesis de la insulina que causen una deficiente calidad química de la misma, o una rápida metabolización de esta, haciendo que llegue una cantidad insuficiente a los IR
- Alteraciones en el IR: Mutaciones y/o modificaciones postraduccionales del IR, lo que ocasiona un incorrecto funcionamiento de este, disminución en el número de IR's, disminución de su actividad catalítica, aumento de la actividad de las fosfatasa de residuos de tirosina (principalmente PTP-1B), o la presencia de anticuerpos antirreceptor.
- Alteraciones post-receptor: Modificaciones en cualquier nivel de las vías relacionadas con la insulina, modificaciones en el IRS, en la síntesis de los transportadores de glucosa entre otros.
- Alteraciones metabólicas: Alteraciones a nivel de tejido adiposo, muscular y hepático asociadas a una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, pueden ser causantes de la resistencia a la insulina, debido a que, al ser un proceso inflamatorio continuo, constantemente se liberan ácidos grasos libres acompañados de citocinas proinflamatorias, como la TNF- $\alpha$ , resistina, interleucinas 1 $\beta$ , 6, 18, lo cual induce la activación del Factor NF- $\kappa\beta$ , desarrollando así una resistencia a la insulina, todo esto debido a una hipertrofia e hiperplasia a nivel de los adipocitos. (Gutiérrez *et al.*, 2017)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 3.2. Diabetes

Según la Organización Panamericana de Salud (**OPS**), la diabetes es “una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, que con el tiempo conduce a daños graves en el corazón, vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y los nervios”. Mientras que la Organización Mundial de la Salud (**OMS**) la define como “una enfermedad crónica que se presenta cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce”. (**OPS, 2021; OMS, 2021**).

### 3.2.1 Clasificación y etiología de la diabetes

La diabetes puede clasificarse en cuatro tipos diferentes, los cuales son:

-Diabetes tipo 1: Este tipo de diabetes también es denominada diabetes insulino dependiente, y consta de menos del 10% de los casos de diabetes, en este tipo existe una destrucción de las células beta pancreáticas, comúnmente debido a factores autoinmunes, que trae como consecuencia el cese de producción de insulina.

-Diabetes tipo 2: La hiperglucemia es debida principalmente a la incapacidad de las células del cuerpo para responder correctamente a la insulina (RI); con el tiempo, el cuerpo empieza a tener una sobreproducción de insulina (Hiperinsulinemia) para intentar nivelar los niveles de glucosa en sangre; su prolongación conlleva a una falla en la síntesis de insulina por parte de las células beta-pancreáticas.

-Diabetes Gestacional: Diabetes que se desarrolla durante el embarazo

-Otros tipos de diabetes: Asociada a enfermedades pancreáticas, genéticas, o problemas debidos a la exposición con ciertas sustancias químicas y/o fármacos



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

**Tabla 3.** Factores etiológicos de la diabetes (UCM,2021; OMS, 2019; IDF,2021; CDC, 2017; ALDANA, 2019)

Tipo de diabetes	Factores etiológicos
Diabetes Tipo 1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Destrucción de células <math>\beta</math>-pancreáticas (Proceso autoinmune)</li><li>• Mutaciones genéticas</li><li>• Factores ambientales</li></ul>
Diabetes Tipo 2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Obesidad</li><li>• Sedentarismo</li><li>• Mala alimentación</li><li>• Resistencia a la insulina</li><li>• Tendencias hereditarias</li><li>• Mutaciones genéticas</li><li>• Factores ambientales</li><li>• Otros padecimientos como: obesidad, dislipidemias, hipertensión arterial, pancreatitis, etc.</li></ul>
Diabetes gestacional	<ul style="list-style-type: none"><li>• Se sugiere que es por el aumento de hormonas y el aumento de peso</li></ul>
<b>Prediabetes</b>	
IGT	<ul style="list-style-type: none"><li>• Se sugiere que es una interacción de factores genéticos y epigenéticos, en combinación con estilo de vida sedentario y mala alimentación.</li></ul>
IFG	

También es importante reconocer a la “prediabetes”, un término que ha tomado más fuerza en los últimos años, también conocido como diabetes no hiper glucémica, hiperglucemia intermedia, y en la literatura inglesa se acuñan los términos “**Impaired Glucose Tolerance**” (IGT) e “**Impaired Fasting Glucose**” (IFG), los cuales son condiciones de valores de glucemia por encima de lo normal, pero a su vez, más bajos que los valores para diagnosticar diabetes. (IDF, 2021)



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

### 3.2.2 Epidemiología

La diabetes se ha posicionado en los primeros lugares de las enfermedades crónicas no transmisibles, a nivel global, en el 2021 hubo 537 millones de personas con diabetes. Las proyecciones de la IDF nos indican que; para el 2030, habrá 643 millones de personas con diabetes, representando casi el 10% de la población mundial adulta, con un rango de 20 a 79 años. Mientras que la proyección para el 2045, es de 783 millones de personas con diabetes, siendo el 11.2% de la población mundial adulta (Figura 9). Este incremento será más notorio en países que se encuentran en vías de desarrollo. (IDF, 2021)

En cuanto a la mortalidad, la diabetes o sus complicaciones fueron las causantes del fallecimiento de 6.7 millones de personas en 2021, con un rango de edad entre 20-79 años, lo cual representa el 12.2% de las muertes a nivel global, lo equivalente a un fallecimiento por diabetes cada 4.7 segundos (excluyendo la mortalidad asociada a COVID-19). (IDF,2021)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

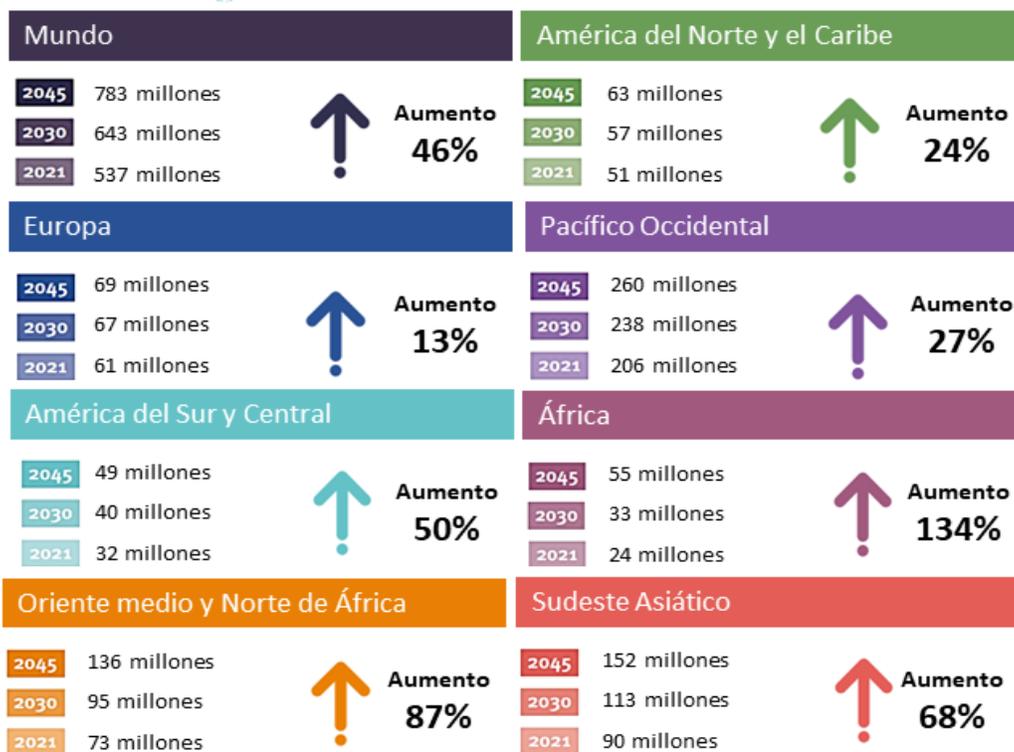
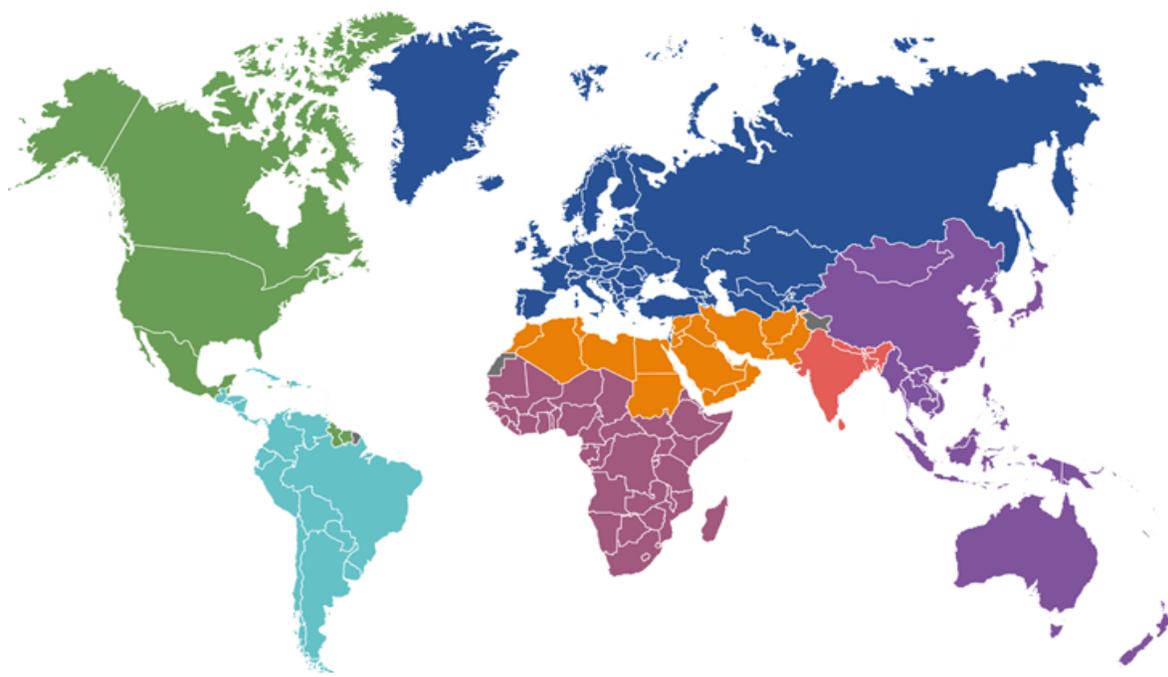


Figura 9. Personas adultas con diabetes en el mundo y por región en 2021, y panorama hacia el 2030 y 2045 (Modificado de: IDF, 2021).



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

En cuanto a la mortalidad, la diabetes o sus complicaciones fueron las causantes del fallecimiento de 6.7 millones de personas en 2021, con un rango de edad entre 20-79 años, lo cual representa el 12.2% de las muertes a nivel global, lo equivalente a un fallecimiento por diabetes cada 4.7 segundos (excluyendo la mortalidad asociada a COVID-19). **(IDF, 2021)**

En cuanto al gasto económico enfocado en la diabetes, se estima que 966 mil millones de dólares fueron gastados en la enfermedad en 2021, con proyecciones a 1.03 billones de dólares para 2030 y 1.05 billones de dólares para 2045. **(Roa, M., 2021)**

México es el séptimo país en el ranking mundial de diabetes, por debajo de países como China, India, Pakistán, Estados Unidos, Indonesia y Brasil. A nivel nacional, existieron 32.2 millones de casos de diabetes, lo cual representa una prevalencia del 16.9% de la población adulta (20-79 años) con esta enfermedad en 2021, a su vez, México ocupa el puesto número 8 en el ranking de los países con mayor gasto enfocado a la diabetes, con 19.9 mil millones de dólares en 2021 **(IDF, 2021)**.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía **(INEGI)**, México cuenta con una tasa de mortalidad para la diabetes de 11.95 personas por cada 10 mil habitantes en 2020, lo que se traduce a 151,019 muertes por diabetes, pasando a ser la tercera causa de muertes a nivel nacional, superada por el COVID-19 y la enfermedad del corazón. **(INEGI, 2021)**



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo* e *in silico*”

## 3.2.3 Fisiopatología de la DT2

La diabetes tipo 2 se da por varios factores etiológicos o por la combinación de algunos de éstos, la insulina juega un papel clave para el desarrollo de dicho padecimiento, ya que es la encargada de la homeostasis de la glucosa, y una alteración en la producción de esta hormona, y/o una inadecuada señalización, aumenta los niveles de glucosa plasmática, pudiendo así desarrollar diabetes. La disminución del número de células  $\beta$ -pancreáticas y el déficit en su funcionamiento, son otros factores que contribuyen al mecanismo fisiopatológico de la diabetes, además de todas las causas antes mencionadas en el apartado 3.1.6 “Resistencia a la Insulina”.

Entre los casos más comunes de DT2 también se asocia a la obesidad (acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud). (OMS, 2022), la cual no distingue edad, etnia o clase social. Ello se debe a la acumulación de células abdominales lipolíticas hiperactivas, que liberan cantidades de ácidos grasos libres hacia la vena porta, incrementando la síntesis de triglicéridos e inhibiendo la captación de insulina (Reynoso *et al.*, 2018)

Para el establecimiento de la DT2 es posible detectar tres fases muy definidas:

-Fase normo glucémica, es la fase en la que los niveles de glucosa en sangre son normales, sin embargo, empiezan los procesos fisiopatológicos que conducen a desarrollar DT2, por lo que ya existe una RI periférica que en algunos casos puede ser perceptible.

-Fase hiper glucémica, en esta fase existe una RI notoria a nivel muscular y tejido adiposo, con niveles altos de insulina que no bastan para regular la concentración de glucosa periférica, incluye niveles de glucemia en ayuno alteradas e intolerancia a la glucosa).



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

-Fase de DT2, Disfunción de las células beta-pancreáticas debido al desgaste por un ritmo constante acelerado de síntesis de insulina, cayendo los niveles de insulinemia y aumentando los niveles de glicemia en ayuno, en esta fase la enfermedad ya es notoria, ya que suelen surgir las complicaciones que conlleva la DT2. (ALAD, 2019; ALDANA, 2019)



**Figura 10.** Factores involucrados en el desarrollo de DT2 (Tomado de: ALDANA, 2019).



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

### 3.2.4 Diagnóstico de la DT2

Debido a que la diabetes es una enfermedad multifactorial, se requieren de distintos métodos de diagnóstico, los cuales se basan principalmente en la medición de la glucosa en sangre (Tabla 4), además se necesita verificar si existen síntomas en el paciente característico de la diabetes, como lo puede ser la presencia de cansancio excesivo, polidipsia, poliuria y polifagia, así como pérdidas repentinas de peso involuntarias. (ALAD, 2019)

Las distintas asociaciones de diabetes como la ADA (American Diabetes Association), la ALAD (Asociación Latino-Americana de Diabetes) y la IDF (International Diabetes Federation), concuerdan en los parámetros de glucometría para el diagnóstico de Diabetes tipo 2, así como en los niveles de alto riesgo de desarrollar DT2, o también llamado “pre-diabetes”.

**Tabla 4.** Criterios para el diagnóstico de DT2 o pre-diabetes (ADA, 2022; ALAD, 2019; IDF, 2021)

Prueba	Prediabetes	Diabetes Tipo 2
HbA1C	5.7% - 6.4%	≥6.5%
Glucosa en Ayuno	100 – 125 mg/dL	≥126 mg/dL
Glucosa Posprandial*	140 – 199 mg/dL	≥200 mg/dL
Glucosa Aleatoria	--	≥200 mg/dL

\*La prueba de glucosa posprandial está recomendada por la ALAD únicamente para pacientes ya diagnosticados con DT2, y la recomiendan sólo para evaluar el efecto del tratamiento sobre los niveles de glucemia tras la ingesta de los alimentos, y de esta forma hacer un ajuste en las dosis.



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Adicionalmente, la **IDF** incluye 2 términos para subclasificar a la prediabetes, los cuales son la Intolerancia a la Glucosa, que se diagnostica cuando existen niveles de glucemia en ayuno  $\geq 126$  mg/dL junto con glucemias posprandiales de 140 – 199 mg/dL.

Y la alteración de la glucemia en ayuno o glucemia basal, diagnosticada con glucemias en ayuno de 110 – 125 mg/dL, pero con glucemias posprandiales normales. (**IDF, 2021**).

### 3.2.5 Tratamiento para la DT2 y la prediabetes

Existen dos clasificaciones generales para el tratamiento de la DT2 y de la prediabetes, los cuales se pueden complementar entre sí para lograr mejores resultados:

**Tratamiento farmacológico:** consta de una farmacoterapia que incluye varios grupos de fármacos cuyo objetivo se centra en controlar la hiperglucemia y sus demás complicaciones, resultados de la enfermedad, mediante diversos mecanismos de acción, que van desde la sensibilización a la insulina, hasta mecanismos hipoglucemiantes.

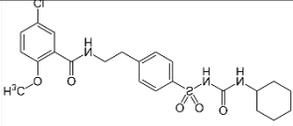
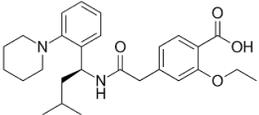
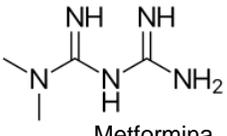
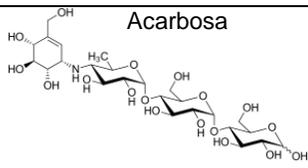
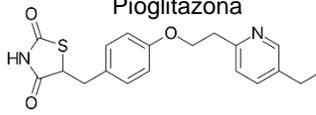
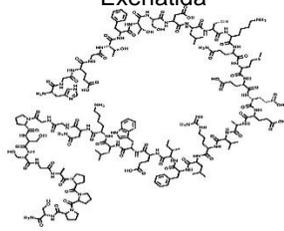
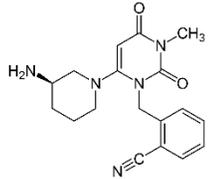
**Tratamiento no farmacológico,** se trata de cambios en el estilo de vida beneficiosos para la salud en general, siendo principalmente el aumento de la actividad física en personas sedentarias, así como mejorar la dieta. (**ALAD, 2019; IDF, 2021**)

A continuación, se enlistan las distintas clases de medicamentos más usados para el tratamiento de la DT2 (Tabla 5).



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

**Tabla 5.** Tratamientos farmacológicos para la DT2 (Olmo *et al.*, 2008; UCSF, 2022)

Clase	Mecanismo de acción	Ejemplos	Estructura
Sulfonilureas	Unión al receptor SUR, bloqueando los canales de K <sup>+</sup> ATP dependientes, estimulando la secreción de insulina	Tolbutamida, Glimepirida, Glipizida, Glibenclamida,	 <p style="text-align: center;">Glibenclamida</p>
Glinidas o Meglitinidas		Repaglinida, Nateglinida	 <p style="text-align: center;">Repaglinida</p>
Biguanidas	Disminuye la RI al aumentar la glucogenólisis, la captación de glucosa periférica y disminuir la gluconeogénesis	Metformina	 <p style="text-align: center;">Metformina</p>
Inhibidores de α-Glucosidasas	Inhiben la actividad de las enzimas encargadas de la hidrólisis de disacáridos en el intestino	Acarbosa	 <p style="text-align: center;">Acarbosa</p>
Tiazolidinedionas	Disminuye la RI por unión a PPAR- γ	Pioglitazona, Rosiglitazona,	 <p style="text-align: center;">Pioglitazona</p>
Análogos de GLP-1	Imitan la acción de GLP-1 al disminuir la secreción de glucagón y aumentar la secreción de insulina de las células beta-pancreáticas.	Exenatida, Liraglutida, Albiglutida, Dulaglutida	 <p style="text-align: center;">Exenatida</p>
Inhibidores de la DDP-4	Inhiben a la DDP-4 aumentando así los niveles de incretinas endógenas	Alogliptina, Sitagliptina, Saxagliptina, Linagliptina	 <p style="text-align: center;">Alogliptina</p>



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Inhibidores del SGLT-2	Inhiben los receptores SGLT-2 del riñón, por lo que bloquean la reabsorción de glucosa.	Canaglifozina, Dapaglifozina, Empaglifozina,	Dapaglifozina 
Insulinas	Facilita la entrada de glucosa a la célula al unirse al receptor de Insulina	Lispor, Aspart, NPH, Glargina	Insulina 

### 3.3 Antecedentes de la Flavona

La flavona (Figura 11) es una molécula perteneciente al grupo de los flavonoides, dicho grupo está presente en diversas frutas, y muestran distintas actividades terapéuticas, como antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, anticarcinogénicas y antidiabéticas, esto debido a la estructura “base” *per se*, la cual corresponde a la molécula de la flavona, además de que los dobles enlaces entre el C2-C3 del anillo B son una característica esencial para el reconocimiento y la fuerte unión a diversos receptores. (Torres-Piedra, 2010).

En un estudio comparativo de distintos flavonoides, administrados en ratas diabetizadas, se demostró que la Flavona tenía un efecto antidiabético pronunciado, junto con algunos de sus análogos, así como efectos benéficos en los niveles de colesterolemia en ratas, sin embargo, no se estudió la posibilidad de una actividad a nivel de las  $\alpha$ -Glucosidasa, ya que no se realizaron CTS, ni CTG, por lo que se propuso evaluarla sola y en conjunto con la Esculetina. (Torres-Piedra, 2010).

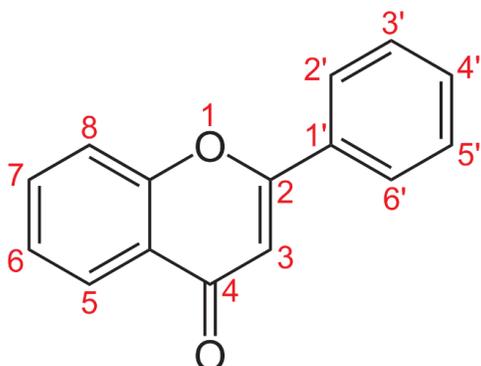


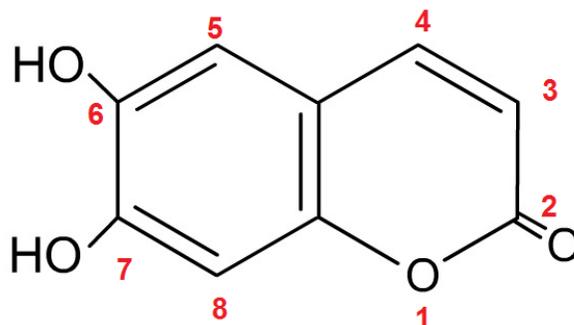
Figura 11. Estructura de la Flavona



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 3.4 Antecedentes de la Esculetina

La Esculetina (Figura 12) es una cumarina presente en diversas frutas, así como en una gran variedad de plantas medicinales orientales. En general, las cumarinas son de gran importancia debido a que son asociadas a diversos efectos benéficos para la salud, en la literatura se pudo encontrar evidencia de que la Esculetina posee efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antiproliferativo, antitumorales y antidiabéticos, se sugiere que cuenta con actividad insulino-sensibilizadora (Zhang et al, 2022), además de presentar efecto antioxidante, actuando a través de la inhibición del estrés oxidativo y la hiperglucemia derivado este mecanismo, sin embargo, no se encontraron artículos científicos donde se evaluara su efecto como inhibidor de  $\alpha$ -Glucosidasa.



**Figura 12.** Estructura de la Esculetina (6,7-Dihidroxicumarina)

# **4. JUSTIFICACIÓN**



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) han tomado gran relevancia en el último siglo, ya que se trata de padecimientos que a pesar de no ser contagiosos, van en constante aumento a nivel global, como es el caso de la diabetes, ya que esta ha tomado gran importancia debido a una acelerada tasa de crecimiento, que afecta tanto a países ricos como a países en vías de desarrollo. (Gonzalez,R., 2018)

Actualmente, México posee el 7º lugar en el ranking mundial de diabetes, con un panorama para 2030 y 2040 poco alentador, ya que se estima que los casos sigan en ascenso continuo, por lo que es de vital importancia la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de la diabetes, valiéndose de la medicina tradicional para la identificación de nuevas moléculas con potencial efecto antidiabético, para ser utilizadas como tratamiento alternativo o complementario, como es el caso de la Esculetina y la Flavona; ambas moléculas se pueden encontrar en frutas y verduras de la ingesta tradicional, como son las uvas rojas, uvas moradas, arándanos, manzanas, apio, perejil, etc. Así como en plantas de la medicina tradicional de distintos lugares, como el Tártago (*Euphorbia lathyris*), castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum*), Fresno sureño (*Fraxinus angustifolia*),etc. (Aguilar S., 2018).

Es por esto, que el presente trabajo de tesis busca generar conocimiento nuevo acerca del efecto antidiabético de la Esculetina y Flavona, como nuevos posibles compuestos bioactivos para el tratamiento de la diabetes, con mayor énfasis en sus posibles efectos como inhibidores de  $\alpha$ -Glucosidasa, evaluando su efecto por separado y en combinación.

# **5. HIPÓTESIS**



## **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”**

La Flavona y la Esculetina presentarán efecto antihiper glucémico y antidiabético, y la combinación de estos en proporción 1:1 molar tendrá un efecto potenciado

# **6. OBJETIVOS**



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 6.1 Objetivo general

Determinar el efecto antihiper glucémico y antidiabético de Esculetina y Flavona en combinación equimolar y por separado en modelos murinos.

## 6.2 Objetivos específicos

-Evaluar el efecto antihiper glucémico de Esculetina y Flavona en combinación equimolar y por separado, mediante curvas de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa en modelos murinos.

-Determinar el efecto antidiabético agudo de la combinación equimolar de Esculetina con Flavona y por separado, en un modelo murino de diabetes experimental no insulino dependiente.

-Evaluar la acción de Esculetina y Flavona sobre  $\alpha$ -Glucosidasa humana en un modelo *in silico*

# **7. METODOLOGÍA**



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 7.1 Reactivos y Equipos

La Esculetina, Flavona, Estreptozotocina, Citrato de sodio y Ácido cítrico, fueron adquiridos del laboratorio Sigma Aldrich Co. St. Louis, MO, USA.

El agua inyectable utilizada para la solución de Estreptozotocina fue adquirido de Laboratorios PISA S.A. de C.V.

## 7.2 Animales

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 de 30g a 50g de peso, alimentados con nutricubos de la marca Purina y agua *ad libitum*. El manejo de estos se llevó a cabo conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) que nos indica las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

## 7.3 Determinación del efecto antihiper glucémico

### 7.3.1 Curva de Tolerancia a la Glucosa (CTG) y a la Sacarosa (CTS) en ratones C57BL/6 normoglucémicos

Para la determinación del efecto antihiper glucémico se realizan dos ensayos, CTG y CTS. Previo al inicio de los ensayos se pesaron los ratones con 16 horas de ayuno y se dividieron en cinco grupos (n=5): 1) Grupo vehículo, 2) Grupo control, 3) Grupo Esculetina, 4) Grupo Flavona, 5) Grupo Combinación Esculetina/Flavona, posteriormente se midieron los niveles de glucemia basales ( $G_0$ ). El grupo 1 fue administrado con 0.5mL de una emulsión Aceite en Agua 1:9, el grupo 2 con 0.5mL del respectivo control, Glibenclamida(5mg/kg) para CTG, y Acarbosa (3mg/kg) para CTS, el grupo 3 con 0.5mL de Esculetina (50mg/kg), el grupo 4 con 0.5ml de Flavona (50mg/kg) y el grupo 5 con 0.5mL de la combinación Esculetina/Flavona 1:1M (**EsFI 1:1M**). Posterior a la media hora de la administración (Vía i.g) se administró una



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

carga de glucosa o sacarosa (2g/kg) según sea el caso, y se monitorearon los niveles de glucemia por 3 horas (0.5, 1, 2 y 3 horas), la medición de niveles de glucemia fue realizada con ayuda de un glucómetro Accu-Check®, modelo performa (Roche).

Para la presentación gráfica de los resultados se usó el porcentaje de variación de glucosa, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Variación de Glucemia} = \left[ \left( \frac{G_x - G_0}{G_0} \right) \times 100 \right]$$

Dónde  $G_0$  indica la glucemia basal, y  $G_x$  la glucemia a cada tiempo. La construcción de las gráficas y el análisis estadístico de los valores obtenidos se realizaron con ayuda del software GraphPad Prism, utilizando la prueba de ANOVA de dos vías y POSTHOC de Bonferroni. (Villalobos, J., 2020)

## 7.4 Determinación del efecto antidiabético

### 7.4.1 Modelo de diabetes experimental no Insulinodependiente (DENID)

Para la determinación del efecto antidiabético primero fue necesario la obtención de un modelo diabético no insulinodependiente a partir de ratones normoglucémicos; para ello se les administró una dosis de Nicotinamida (20mg/kg) vía intraperitoneal, 15 minutos después, se administró Estreptozotocina (**STZ**), en una dosis de 100mg/kg, previamente disuelta en Buffer de citratos a un pH 4.5, protegida de la luz solar y a una temperatura por debajo de los 10°C. Finalmente, se utilizaron aquellos ratones que presentaron una glucemia basal superior a los 180mg/dL a las 2 semanas de la administración. (Chaves, 2019)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 7.4.2 Ensayo antidiabético agudo

Una vez obtenido el modelo DENID, se formaron 5 grupos de ratones (n=5), los cuales se pusieron en un ayuno de 13 horas, se midió la glucosa basal ( $G_0$ ) y a cada grupo se le administró vía intragástrica:

- 1) Vehículo: 0.5ml de vehículo 1:9 Aceite/Agua
- 2) Glibenclamida: 5mg/kg
- 3) Esculetina: 50mg/kg
- 4) Flavona: 50mg/kg
- 5) Combinación EsFl 1:1M: 50mg/kg

Los niveles de glucemia fueron monitoreados a las 1,3,5 y 7 horas posteriores a la administración, los resultados fueron presentados en curvas de porcentaje de variación de glucosa.

## 7.5 Evaluación *in silico*

### 7.5.1 Estudio de acoplamiento molecular bioguiado (Docking Molecular) sobre $\alpha$ -Glucosidasa con Esculetina y Flavona

Se obtuvo del Protein Data Bank (**PDB**), la estructura de una  $\alpha$ -Glucosidasa Humana para realizar el Docking Molecular, seleccionándose la **3LPP** (“Crystal complex of N-terminal sucrase-isomaltase with kotalanol”, con una resolución de 2.15 Å) (**Sim, L., 2010**), ya que dicha estructura cristalográfica, si bien no se trata de la estructura completa, es la parte importante para la hidrólisis de disacáridos (Subunidad N), además de que se encontraba acoplada con kotalanol, sirviendo como referencia para realizar dockings dirigidos. La proteína cuenta con 4 cadenas (A,B,C y D), por lo que se utilizó únicamente la cadena B, debido a que en este lugar se encuentra el sitio de acción o sitio ortoestérico (Asp<sup>231</sup>, Asp<sup>355</sup>, Arg<sup>555</sup>, His<sup>629</sup>). Se utilizaron 3 ligandos: 1) kotalanol previamente unida a la estructura cristalográfica 3LPP, 2) Esculetina y 3) Flavona, estas últimas se construyeron usando el Software de MarvinSketch by ChemAxon (2021).



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Los experimentos de acoplamiento se realizaron en el sitio de unión conocido de la sacarosa-isomaltasa 3LPP, se empleó una caja ubicada en las coordenadas (39.83, 58.58, 78.49) con un tamaño de caja de 20.00 x 20.00 x 20.00 Å<sup>3</sup>, la cual permaneció rígida durante todos los acoplamientos. Los sistemas fueron preparados en el software Chimera (UCSF Chimera, 2021) y el estudio de acoplamiento molecular se realizó con ayuda de AutoDock Vina 1.13.1 (Eberhardt, J, 2021). Por último, se empleó un protocolo para la validación del sistema, sacando la desviación cuadrática media (RMSD) de las 150 salidas por ligando.

Los mapas de interacción de Esculetina y Flavona con el sitio de acción se realizaron en el Software Molecular Operating Environment y PyMOL versión 1.7, mientras que las imágenes fueron creadas en ChimeraX.

### 7.5.2 Docking Molecular “Ciego” sobre $\alpha$ -Glucosidasa con Esculetina y Flavona

Este estudio se llevó a cabo sobre la misma  $\alpha$ -Glucosidasa (3LPP), sin embargo, se amplió la caja de tal forma que abarcara toda la proteína (70 x 70 x 70 Å<sup>3</sup>). Se realizaron 50 acoplamientos independientes para Esculetina y Flavona, debido a que la finalidad de este ensayo era únicamente ver la afinidad de las moléculas al sitio orto estérico, esto gracias a que no se condiciona espacio en donde se debe acoplar la molécula, como se hace en un Docking biodirigido.

# **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 8.1 Determinación del efecto antihiper glucémico

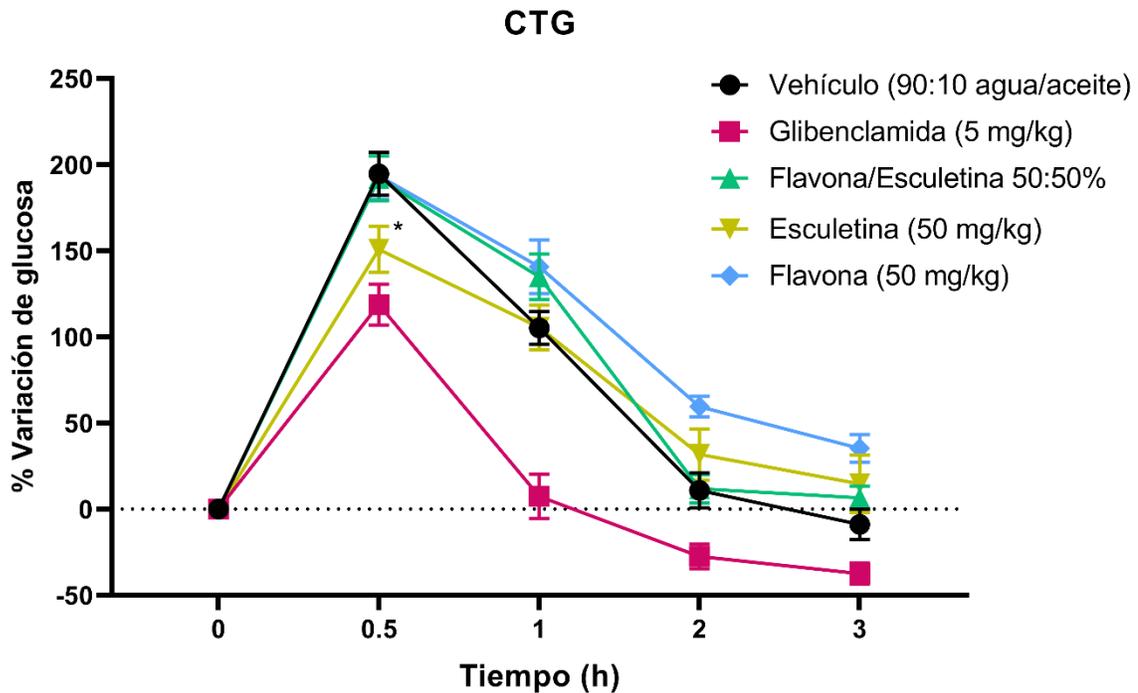
La realización de curvas de tolerancia a la sacarosa y a la glucosa son una guía para la determinación preliminar de los posibles mecanismos de acción antihiper glucémicos que pudiera tener un compuesto bioactivo, en las primeras 3 horas tras ser administrada la carga de azúcar, principalmente aquellos mecanismos que implican la ruptura y absorción de azúcares compuestos, o la absorción de la glucosa y otros monómeros (Ornelas, 2018).

### 8.1.1 Curva de tolerancia a la glucosa

En la Gráfica 1 se puede observar que la Flavona sola como en combinación con Esculetina no posee actividad anti hiper glucemiante, ya que su efecto fue nulo, equiparables al vehículo utilizado, por lo que se puede descartar los posibles mecanismos de acción relacionados a una actividad extra pancreática, como puede ser la inhibición de transportadores o cotransportadores de glucosa. Por otra parte, la Esculetina si posee un efecto antihiper glucémico significativo a la media hora, aunque no tan pronunciado como la glibenclamida, por lo que se podría pensar en una escasa actividad sobre los transportadores de glucosa, o incluso en algún mecanismo insulinosensibilizador o estimulador de la secreción de insulina de las células  $\beta$ - pancreáticas (Guzman, 2015).



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



**Gráfica 1.** Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratones normoglucémicos. Los valores de cada punto representan el error estándar medio ( $\pm$ EEM). \* $p < 0.05$  comparado con el vehículo.

## 8.1.2 Curva de tolerancia a la sacarosa

Este ensayo se caracteriza por medir la capacidad de los compuestos de intervenir en el metabolismo (hidrólisis) de los disacáridos, trisacáridos u oligosacáridos a sus monómeros, así como en su absorción a nivel intestinal, viéndose reflejado en los niveles de glucemia (Amaral, 2020)

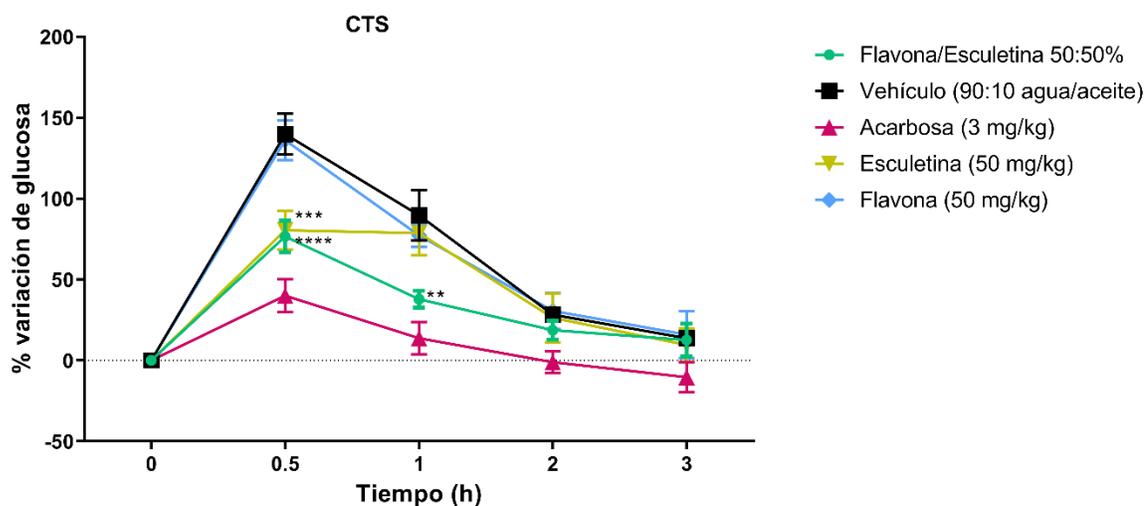
Para este ensayo, la Flavona en una dosis de 50mg/kg no presentó actividad antihiper glucémica *per se*, sin embargo, la Esculetina si presentó un efecto antihiper glucémico significativo a la media hora, en una dosis de 50mg/kg (Gráfica 2), por otra parte, la combinación **EsFI 1:1M** en una dosis de 50mg/kg, tuvo un efecto significante que se mantiene hasta la hora 1, muy similar al efecto producido por la Acarbosa (3mg/kg), el cual, es un medicamento reconocido por su acción inhibitoria sobre las  $\alpha$ -Glucosidasas (Amaral, 2020)



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Estos datos sugieren que la Esculetina tiene potencial actividad inhibitoria de  $\alpha$ -Glucosidasas, mientras que se podría pensar en la flavona como un posible potenciador de la acción de la Esculetina, de esta manera, los disacáridos y demás productos resultantes del metabolismo de carbohidratos, no serían hidrolizados a monómeros, por lo que su absorción se vería impedida a nivel intestinal, lo que resulta en una disminución en el pico hiper glucémico. (Amaral,2020; Aldana, 2019)

Con base a estos resultados obtenidos, se procedió a evaluar los compuestos en ensayos antidiabéticos, así como en estudio de Docking molecular sobre  $\alpha$ -Glucosidasas.



**Gráfica 2.** Curva de Tolerancia a la Sacarosa en ratones normoglicémicos. Los valores de cada punto representan el error estándar medio ( $\pm$ EEM). \* $p < 0.05$  comparado con el vehículo.

### 8.2 Determinación del efecto antidiabético

Para la realización de este ensayo se empleó el modelo DENID. En la Gráfica 3, se observa un efecto antidiabético significativo de los compuestos a la hora 3, donde la Esculetina (50mg/Kg), tuvo un importante efecto en los niveles de



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

glucemia, reduciéndolos por debajo del 50%, con mayor eficacia respecto a la Glibenclamida (5mg/Kg), observando un mayor efecto a la hora 5 (disminución del 70.3%), razón por la cual se detuvo el ensayo, para evitar la muerte de los ratones por hipoglucemia, debido a que habían ratones con niveles de glucosa en sangre por debajo de los 60mg/dL. Para el caso de la flavona, se observó un importante descenso en la glucemia a partir de la hora 5, equiparable al efecto de la Glibenclamida, sin embargo, lo más destacable de la acción de la flavona fue la reducción del 78.6% en los niveles de glucemia a la hora 7, quedando de igual manera, junto con la Esculetina, por debajo del efecto causado por Glibenclamida en la glucemia a dicha hora, no obstante, el efecto se pierde al administrarse la combinación equimolar de Flavona/Esculetina 1:1M.

Con los resultados obtenidos en las CTG y CTS, se puede dar sustento a la posibilidad de mecanismos extrapancreáticos e insulinosensibilizadores por parte de Esculetina y Flavona, así como mecanismos relacionados con la inhibición de  $\alpha$ -Glucosidasas; existe bibliografía (Nurul Islam, 2013), donde se encontró que algunos compuestos extraídos de *Artemisia capillaris*, entre los que destacan Cumarinas, Flavonoides y algunos compuestos fenólicos, presentan actividad inhibitoria de la PTP1B, así como actividad sobre las  $\alpha$ -Glucosidasas, por lo que, al ser de la misma familia, es posible relacionar estos efectos directamente con Esculetina y Flavona; aunado a esto, en lo reportado por Souza (2021), la Flavona es un potente antioxidante, eficaz para combatir las complicaciones de la diabetes por causa del estrés oxidativo.

Según Henriksen (2011), el estrés oxidativo es capaz de generar, entre muchas otras cosas, resistencia a la insulina, ya que en los receptores de insulina, bajo condiciones altamente oxidantes, se favorece la fosforilación de algunos residuos de Serina, entre los más destacables la Serina 307 del IRS-1, por lo que al evitarse la fosforilación de los residuos de Tirosina, y favorecerse la fosforilación

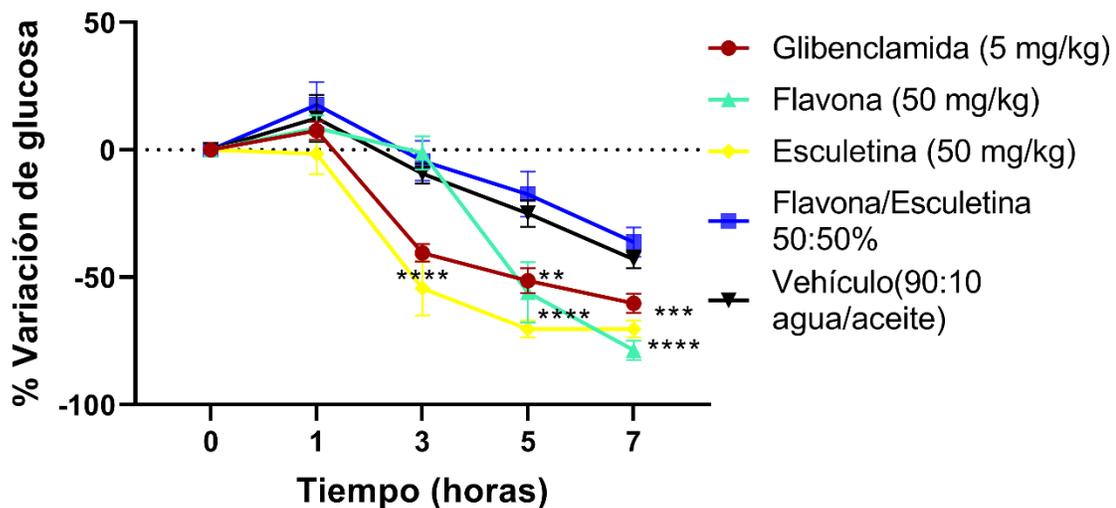


## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

de residuos de Serina, se impide la transducción de señales para la vía PIP3K, dando como consecuencia resistencia periférica a la insulina.

Esto también podría explicar la nula actividad en el ensayo antidiabético de la combinación de EsFI 1:1M, ya que ambos pueden estar actuando por diferentes vías, y al ser una cantidad menor de cada compuesto (debido a que la dosis de la combinación es de 50mg/kg), no se alcanza a generar el efecto durante las 7 horas del ensayo. Esto nos indicaría que es necesaria una dosis de 50mg/kg de cada compuesto por separado, para que se pueda alcanzar un importante efecto antidiabético.

### Antidiabético Agudo



**Gráfica 3.** Ensayo antidiabético agudo en ratones diabéticos. Los valores de cada punto representan el error estándar medio ( $\pm$ EEM). \* $p < 0.05$  comparado con el vehículo.

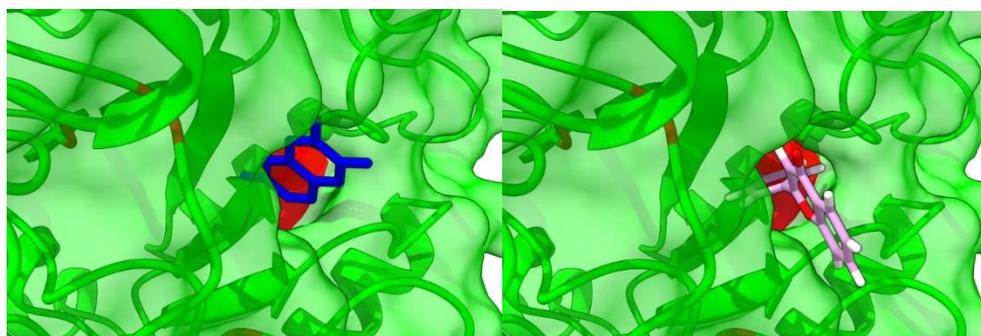


# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

## 8.3 Evaluación *in silico*

El estudio de acoplamiento molecular (Docking Molecular) se llevó a cabo con la finalidad de conocer las interacciones de la Esculetina, Flavona, así como la combinación de estas, como posibles inhibidores de  $\alpha$ -Glucosidasas, tomando en cuenta los resultados obtenidos durante la CTS, para estos ensayos se tomó la proteína Sacarasa-Isomaltasa Humana (**3LPP**), la cual se encarga de la hidrólisis de la sacarosa, así como de la maltosa (**Sim, L., 2010**), esta estructura cuenta con una buena resolución para realizar el acoplamiento (menor a 2.5 Å); utilizándose únicamente la cadena “B” de un total de 4 sub-unidades, ya que es principalmente en esta y en la cadena “D”, donde se encuentran los sitios de acción para la hidrólisis de sacarosa (**Sim, L., 2010**).

Para la validación del sistema, fue necesario realizar 150 acoplamientos independientes de kotalanol (ligando de la estructura cristalográfica 3LPP) sobre la subunidad B, posteriormente se sacó RMSD de los acoplamientos contra la estructura cristalográfica, dando  $1.37 \pm 0.61$  (**Soto N., 2020**). Una vez validado el sistema, se procedió a realizar 150 acoplamientos biodirigidos independientes para Esculetina y Flavona, presentando Esculetina una energía de afinidad de unión de  $-7.9 \pm 0.1$  kcal/mol, y en el caso de Flavona, presentó una energía de afinidad de unión de  $-5.4 \pm 0.3$  kcal/mol, ambos sobre el sitio ortoestérico (Figura 11).

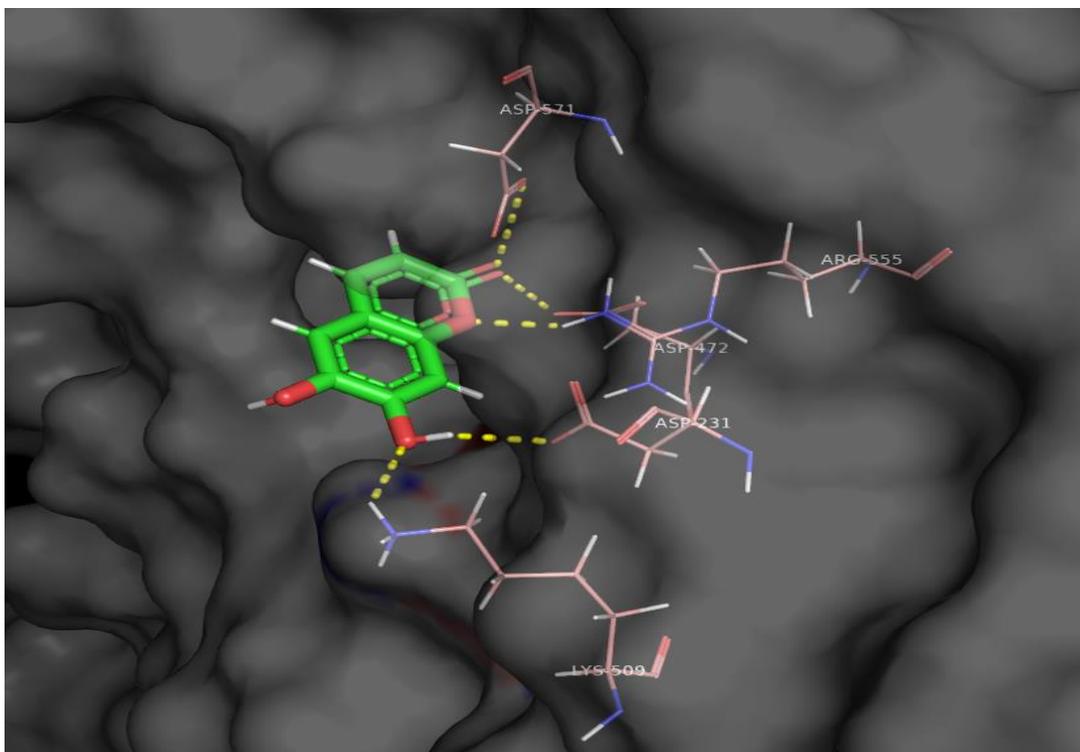


**Figura 13.** Acoplamiento de Esculetina y Flavona con la sacarosa-isomaltasa Acoplamiento de Esculetina (Derecha) y Flavona (Izquierda) sobre el sitio orto estérico (color rojo) de la subunidad B de la sacarosa-isomaltasa. (Imágenes creadas con el Software ChimeraX v1.3)



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

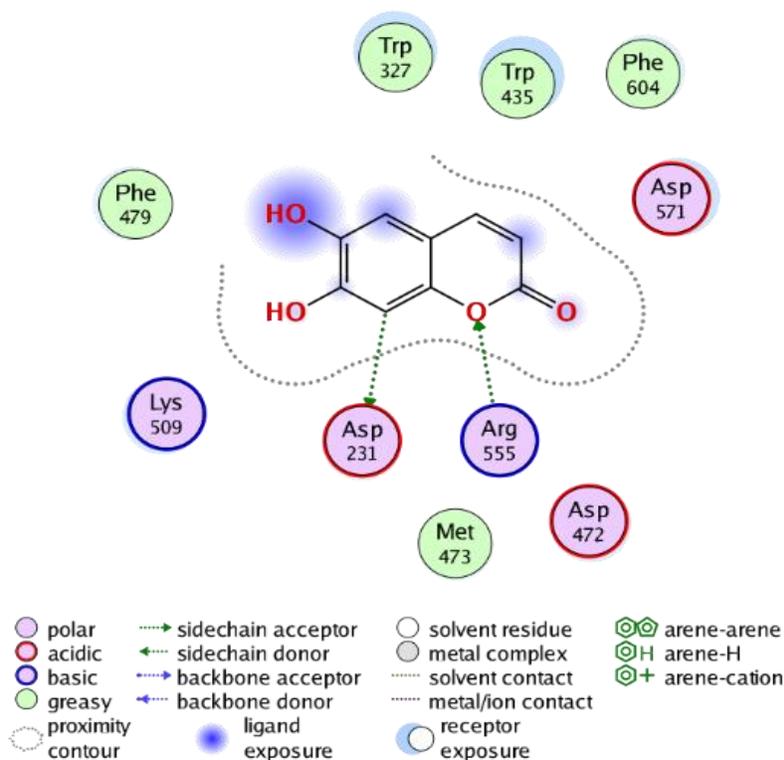
Una vez obtenidos los acoplamientos se procedió a realizar mapas de interacción, donde se observó que la Esculetina interacciona con el sitio orto estérico de la subunidad B de la enzima mediante interacciones de puentes de Hidrógeno (OH posición 7 - Lys<sup>509</sup> y el oxígeno bencénico - Arg<sup>555</sup>) y puente de Hidrógeno reforzado (OH posición 7 - Asp<sup>231</sup>) con el sitio catalítico, mediante mapas de interacción (Figuras 12 y 13), mientras que la Flavona presentó interacciones más débiles (Figuras 14 y 15 ), como lo son  $\pi$ -H (Anillo aromático-Leu<sup>233</sup>) y puente de Hidrógeno reforzado (Anillo aromático de la posición 2- Asp<sup>571</sup>), presentando así mayor afinidad el compuesto Esculetina sobre el sitio ortoestérico.



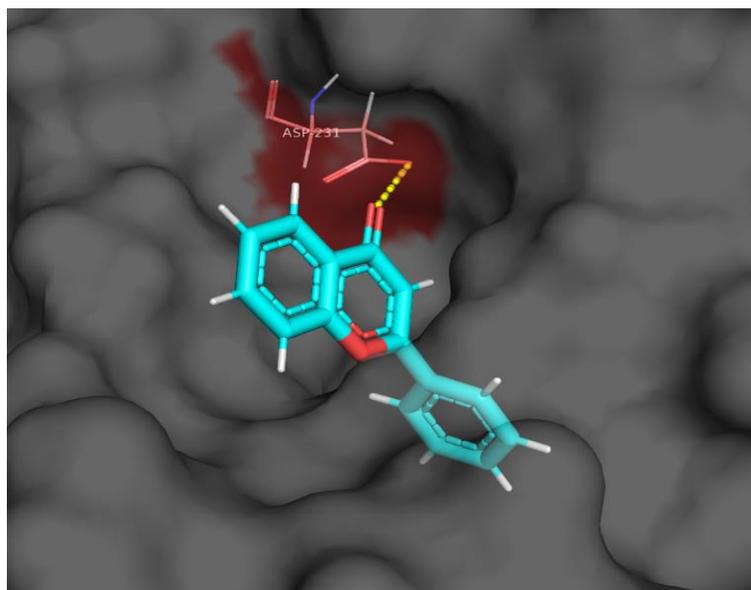
**Figura 14.** Mapa de interacciones de la Esculetina con el sitio de acción de la sacarasa-isomaltasa (Imagen creada con el software PyMOL v2.2)



# “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



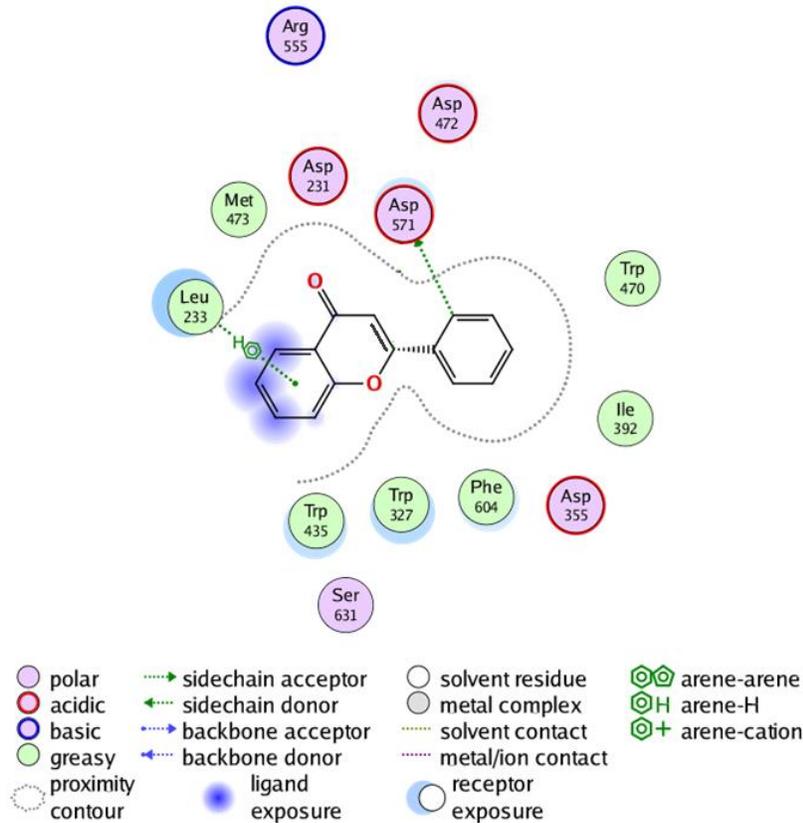
**Figura 15.** Mapa de interacciones de la Esculetina con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (Imagen creada con el software Molecular Operating Environment v2020.02)



**Figura 16.** Mapa de interacciones de la Flavona con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (Imagen creada con el software PyMOL v2.2)



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo* e *in silico*”



**Figura 17.** Mapa de interacciones de la Flavona con el sitio de acción de la sacarosa-isomaltasa (Imagen creada con el software Molecular Operating Environment v 2020.02)



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Posteriormente, dados los resultados obtenidos durante la CTS, se realizó un Docking a ciegas, con el único fin de evaluar que ambas moléculas tuvieran afinidad sobre el sitio ortoestérico, o bien, afinidad ante algún sitio alostérico, dándoles libertad al definir la caja lo suficientemente grande para abarcar toda la subunidad B.

En este ensayo a ciegas, los resultados de la Esculetina nos indica 3 sitios de unión, cayendo en el sitio ortoestérico un 64% de las veces, con una energía de afinidad de  $-7.9 \pm 0.2$  kcal/mol, y en sitios alostéricos el 36% de las veces, con energías de afinidad de  $-5.4 \pm 1.2$  kcal/mol. Por otra parte la flavona tuvo 2 sitios de unión, cayendo en un sitio ortoestérico un 46% de las veces, con una energía de afinidad de unión promedio de  $-6.3 \pm 0.3$  kcal/mol y en el sitio alostérico un 54% de las veces, con una energía de afinidad promedio de  $-7.9 \pm 0.4$  kcal/mol. (Tabla 7).

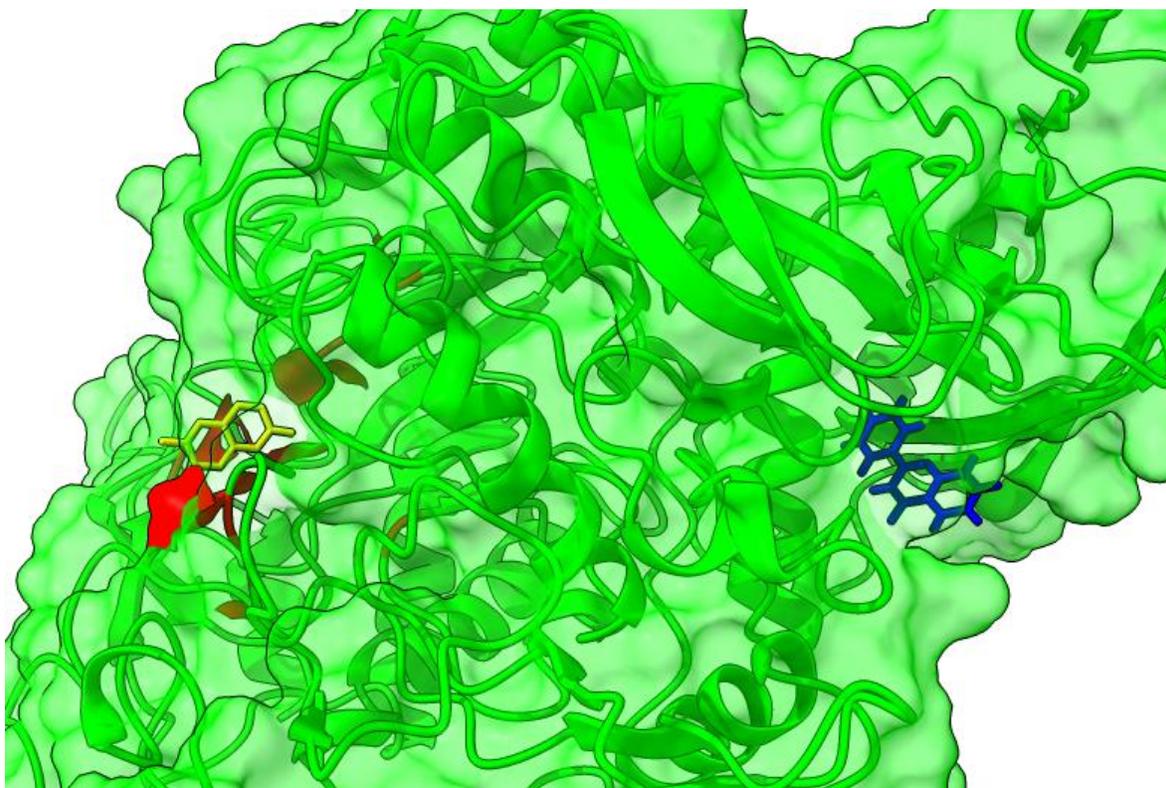
**Tabla 7.** Resultados del Docking Molecular “Ciego”

Molécula	Acoplamiento en sitio			
	Ortoestérico		Alostérico	
Esculetina	%	Energía de afinidad (kcal/mol)	%	Energía de afinidad (kcal/mol)
	<b>64</b>	<b><math>-7.9 \pm 0.2</math></b>	36	$-5.4 \pm 1.2$
Flavona	%	Energía de afinidad (kcal/mol)	%	Energía de afinidad (kcal/mol)
	46	$-6.3 \pm 0.3$	<b>54</b>	<b><math>-7.9 \pm 0.4</math></b>



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Con estos resultados se puede deducir que la Esculetina presenta mayor afinidad sobre el sitio orto estérico, mientras que Flavona posee mayor afinidad a un sitio alostérico, esto junto a los resultados obtenidos en CTS, puede sostener la hipótesis de que Flavona actúa sobre éste otro sitio alostérico, realizando un cambio conformacional sobre la sacarosa-isomaltasa en el sitio ortoestérico, generando así una mayor afinidad y/o retención de la Esculetina actuando en el sitio ortoestérico de la enzima, razón por la cual se presentaría un posible efecto potenciando al momento de administrar la combinación Flavona/Esculetina (Figura 16).



**Figura 18.** Modelo propuesto de la interacción de la combinación Esculetina/Flavona 1:1M con la sacarosa-isomaltasa, actuando la Esculetina (color amarillo) sobre el sitio ortoestérico (color rojo), y la Flavona (color azul) sobre un sitio alostérico. (Imagen creada con el software ChimeraX v1.3)

# **9. CONCLUSIONES**



## **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”**

La Esculetina y Flavona poseen efecto antihiper glucémico y antidiabético a través de un posible efecto sinérgico potenciado de ambas moléculas en combinación, destacando la acción como inhibidores de  $\alpha$ -Glucosidasas, así como un posible efecto insulinosensibilizador.

Los estudios *in silico*, propusieron un modelo de unión de la Esculetina/Flavona con la  $\alpha$ -Glucosidasa, sugiriendo la acción de la Esculetina como inhibidor de  $\alpha$ -Glucosidasas, siendo potenciado por la Flavona, dando más sustento a los efectos mostrados durante la curva de tolerancia a la sacarosa.

# **10. PERSPECTIVAS**



## **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo* e *in silico*”**

1. Evaluar Esculetina y Flavona directamente sobre  $\alpha$ -Glucosidasas
2. Evaluar Esculetina y Flavona sobre PTP1B
3. Determinar el mecanismo de acción de Flavona como antidiabético
4. Docking Molecular de Esculetina y Flavona sobre PTP1B
5. Dinámica molecular de la combinación Esculetina/Flavona sobre la sacarosa-isomaltasa humana.

# **11. REFERENCIAS**



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



ADA. (2022). *Standards of Medical Care in Diabetes—2022 Abridged for Primary Care Providers*. American Diabetes Association.

<https://diabetesjournals.org/clinical/article/40/1/10/139035/Standards-of-Medical-Care-in-Diabetes-2022>

Aguilar, S. (2018). Evaluación del efecto del tratamiento con carbón activo en la composición de polifenoles durante la eliminación de clorofilas en extractos de plantas. [Tesis de grado]. Universidad de Jaén.

ALAD. (2019). Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia Edición 2019. *Revista De La ALAD*. Retrieved 12 October 2022, from.

Amaral, D. (2020). Hexane fraction from Brazilian *Morus nigra* leaves improved oral carbohydrate tolerance and inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities in diabetic mice. *Natural Product Research*, 35(22), 4785-4788.  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1723087>

BRANDAN, N. (2011). *HORMONAS PANCREÁTICAS*. Lecture, ARGENTINA.

Brunton, L. (2019). *LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA* (13th ed.). McGRAW-HILLS INTERAMERICANA EDITORES  
CDC. (2017, diciembre). *La diabetes gestacional*. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.  
<https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/basics/gestational.html>

Cerón, L., (2016). “*Estudio del efecto antidiabético subagudo de un derivado semisintético del ácido morónico en un modelo experimental de diabetes no insulino dependiente y determinación de factores moleculares*”. Cuernavaca: UAEM.

Chávez, F. (2019). *Estudio farmacológico, toxicológico y químico preliminar de Achillea millefolium y Plantago australis como potenciales agentes antidiabéticos*. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. UAEM.

Deng, D. (2016). GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. *Protein Science*, 25(3), 546-558.  
<https://doi.org/10.1002/pro.2858>

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A.F., Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://vina.scripps.edu/>



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

González, R. (2018). Comportamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles en adultos mayores. *Finlay*;8(2):103-110.

Gutiérrez, C. (2017). *Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización*. GACETA MÉDICA DE MÉXICO. 8 June 2022, from <http://www.anmm.org.mx>.

Guzmán, R. (2015). *Obtención y evaluación del efecto antidiabético de algunos derivados de ácido ursólico*. Tesis de maestría. Facultad de Farmacia. UAEM.

Henriksen, E. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology And Medicine*, 51(5), 993-999. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005>

IDF. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (10th ed.). IDF.

INEGI. (2021). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES (14 DE NOVIEMBRE)*. MÉXICO: INEGI.

Machado, T. (2019). Transportadores de glucosa: características genéticas, moleculares y fisiopatológicas. *Acta Médica Del Centro*, (4). Retrieved 12 October 2022, from.

Marvin was used for drawing, displaying and characterizing chemical structures, substructures and reactions, Marvin version 21.17.0, ChemAxon <https://www.chemaxon.com>

Medina, G. (2000). *PPAR y tiazolidinedionas, algo más que un tratamiento contra la diabetes*. Cambridge: *Department of Medicine and Clinical Biochemistry. Addenbrooke's Hospital*. University of Cambridge.

Millán, C. (2015). *Absorción intestinal de la glucosa. Transportadores de glucosa*. Zaragoza, España: Universidad Zaragoza.

Molecular Operating Environment (MOE), 2022.02 Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2022. <https://www.chemcomp.com/index.htm>

Nurul Islam, M. (2013). Potent  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Archives Of Pharmacal Research*, 36(5), 542-552. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0069-7>



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”

Olmo, E. (2008). Actualización del tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2. *Sistema Nacional De Salud.*, (1), 1-16. Retrieved 12 October 2022, from.

OMS. (2021). *Diabetes*. Who.int. Consultado el 5 May 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.

OPS (2021) *Diabetes*  
<https://www.paho.org/es/temas/diabetes#:~:text=La%20diabetes%20es%20una%20enfermedad,los%20ri%C3%B1ones%20y%20los%20nervios>.

Prabakaran, D. (2012). *Antihyperglycemic effect of esculetin modulated carbohydrate metabolic enzymes activities in streptozotocin induced diabetic rats*. Retrieved 12 October 2022, from. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.05.005>

Reynoso, J. (2018). La obesidad y su asociación con otras de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Journal Of Negative & No Positive Results*. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.2520>

Rincon, N. (2019). Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa mediante flavonoides de origen natural como vía de control en el desarrollo de diabetes mellitus. *Biociencias*, (2), 129-148. Retrieved 12 October 2022

Roa, M. M. (2021, 12 noviembre). 537 millones de adultos viven con diabetes en el mundo, cifra que va en aumento. *Statista Infografías*. <https://es.statista.com/grafico/6698/la-expansion-de-la-diabetes/>

Sanchez, P. (2008). *Guía de actualización en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y sus complicaciones* (pp. 17-25). Madrid: Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario.

Sim, L. (2010). Crystal complex of N-terminal sucrase-isomaltase with kotalanol. *Elsevier*. <https://doi.org/10.2210/pdb3lpp/pdb>

Soto, N. (2020) *Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante de la 7-hidroxi flavona en anillos de aorta aislada de rata: estudios in silico y funcionales*. Tesis de licenciatura. Facultad de Farmacia. UAEM.

Souza, S. (2021). Analysis of Conformational, Structural, Magnetic, and Electronic Properties Related to Antioxidant Activity: Revisiting Flavan, Anthocyanidin, Flavanone, Flavonol, Isoflavone, Flavone, and Flavan-3-ol. *ACS Omega*, 6(13), 8908-8918. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06156>



## “Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”



Suren, S. (2022). Mechanistic insights into the biochemical and pharmacological profile of esculetin. <https://doi.org/10.20944/preprints202208.0468.v1>

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC. <https://pymol.org/2/>

Torres-Piedra, M. (2010). A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 45(6), 2606-2612. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.049>

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461. <https://vina.scripps.edu/>

UCM. (2021 ). *Intolerancia a la Glucosa: Estudios de intolerancia a la Glucosa* Recuperado 5 de Octubre de 2022, de <https://www.ucm.es/catedra-ucm-clas/intolerancia-a-la-glucosa>

UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12. <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>

UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. *Protein Sci*. 2021 Jan;30(1):70-82. <https://www.rbvi.ucsf.edu/chimerax>

UCSF. (2022). *Diabetes Education Online*. Consultado el 9 Jul 2022, de <https://dtc.ucsf.edu/es/tipos-de-diabetes/diabetes-tipo-2/tratamiento-de-la-diabetes-tipo-2/medicamentos-y-terapias-2/terapias-no-insulinicas-para-la-diabetes-tipo-2/tabla-de-medicamentos/#Metformin>.

Villalobos, J. (2020). VARIABILIDAD GLUCÉMICA COMO PARÁMETRO DE CONTROL METABÓLICO EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 1. Venezuela, S.V.E.M. <https://www.redalyc.org/journal/3755/375566092003/html/>

Zhang, L. (2022). Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *Phytotherapy Research*, 36( 1), 279– 298. <https://doi.org/10.1002/ptr.7311>



## **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo e in silico*”**



Zhao, R. (2007). Antidiabetic activity of flavone from Ipomoea Batatas leaf in non-insulin dependent diabetic rats. *International Journal Of Food Science And Technology*, 42, 80–85. Retrieved 4 August 2022, from.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Licenciatura en Farmacia

Fecha: 01 de junio del 2023

Asunto: VOTOS APROBATORIOS

Medio de notificación: Electrónico

Folio: FF/D/SD/JLF/93/2023

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**U.A.E.M**  
**PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **“Evaluación del efecto antihiper glucémico y antidiabético de una mezcla de Esculetina/Flavona en modelos experimentales *in vivo* e *in silico*”** presentado por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. José Sebastian Sánchez Tlatelpa (10010966)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**Jurado**

**Firma**

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

\_\_\_\_\_

Dr. Julio César Almanza Pérez

\_\_\_\_\_

Dr. César Millán Pacheco

\_\_\_\_\_

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

\_\_\_\_\_

Dr. Luis Arias Durán

\_\_\_\_\_



Atentamente

**“Por una humanidad culta  
una Universidad de excelencia”**

**M.P.D. REYNA AMÉRICA SERRANO LÓPEZ**  
**SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.c.p.: archivo  
\*BEDM

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.  
Tel. (777) 329 7000.



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ** | Fecha:2023-06-06 02:43:45 | Firmante

BkLt2XIWIU832cSdIPpO0qM68208DkNYZvg+0GRdLoDN+MU5Cnbz/oJFxE3iEclVIFw16Uf2kWt8lz17Bo2dzzOmlxzBCfyDIRiiq68ddOxOpznWY9E96yhnk1DFIKnXlyJgOXet9N1n0ofzFXPHp5c+ASYv7l1xpZmmolZOBbYKvH2xynelNoWMqhBhbyyuej8OHU87NNckM7oVSfKXGBcqfMiwAuHITJFZpmQrMzBV6DZbs1wDXBaC9t+ZzrlBEFDHG2ABOhng2qqSz/ubgb+aT3/o9870ITid4zkOK3I8u/MA5Y147wEdhcqZy7g0ix3rpixcMLclExnqfaA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[tSxmvkh4z](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LpK8eXQ6rc38mNAQdiOMKIDBjv2TMyh>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2023-06-06 14:46:24 | Firmante**

Kf2wUGa7hOBnzp5bWZ2VMt7+sxMhnQkqbXLFXtjbi81DV/mFPRTPfdImE8q+ZEa1q/aK9hTF2omtNX8ShA+rwk8hdmfGYAzse4gJZsGLtc6ZyWdfipseEEjDY+QnAAoTiG6/o1M4PYZ/T9OekdheWDRB50ehj7FaM8iQB3qDMEkgEv73X0O2z+iz6LPd4w5RHfPE5cyKFTZmNhya4J9TNwNeWJlryOTiGt/fzMrz1FSjTDF5i7oBM+ZSY7CawLEV+CXIZfLZsINSZ6pNwQno33uf9pxuTZr5HzugxA919hUK9rLIF0wKOkmnaN/cjrY1DDxv00x110IAtjL2bL7XpoA==

**JULIO CESAR ALMANZA PEREZ | Fecha:2023-06-06 15:14:55 | Firmante**

kKL0XgGdlgRJKTV6z97pbn42v8FETSM9385AEvjuHfX9toiYto0f8GqMinWqbbpvq5+PVMb3jyHl1Wutwv/dpdMNFt412uzFhXAqdfveLQgjs/tmY3EKv66/2ppbdDbVYo/Z+D1xkFdE NM6Vw2OFH/EAl42PPqanLOIMfUC+6AmVFi34yd92sPsaMMmvoWz+CeKpvyxTab0Y6o3baRpVmJQ6bcdOMV6AgHfYydvBUlJBFJ7Y9f9ewAHCLF6WkyxTMGcXKKQyJ2kr/L DkDRm6Q1le+YziVpM5+PrUJqtzFt9tgkM8cyuTXILf1wmWCegupJdB2Yxv2n2kX/nPDTw==

**LUIS ARIAS DURAN | Fecha:2023-06-06 15:20:08 | Firmante**

Uofm5XSP5hrAlzGi480/4otT4t3ynV9tlC56UwzzLpEaxeUbWxrD41DUmeKhl1luhNz12s8lmyMHW114AKKdzZj/raTUkae3TmMlIFKHgk+QMjOqcvUruaxVDgY9w9mtDDiRXT4ODz XaTDDekqbSxda378VaxQrdayRqBO4lvbUgN3r9pjVu0SkDfVf26AHmxjYJqom4STtN94wj/SR0uvNYP0uXDXB+WNnPGCg5+9ySiCT/oJMi8w1RKQsg7ldTdbhgebRg4DL04i6H PxsSdyx0n+O3nk14qBt2jziJ9GkZbsr9AmB36XYkUZbpxqTvlqBxwo2hluxhADB7/iRw==

**JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2023-06-06 17:46:36 | Firmante**

eQIDy8NuNoOipMh9e4Dq9gmhOHw+bfU2N2WsWljiNhtM88uWYXpYe2tKsplzK5VbXLRFTFAc69MxcKq8V+SCUzLsCzmxQcTpqlt4X4artEnsBXcdUV4fYRmJThW8PYAUvXjJ PZbCBqsiETrxKtbCjGkVoTU43q16YW/TPmj8S1FXJWRojhPmYr9nV8u7JS6O8yYltjLvysIROr+dDpInfvGkNzibjOSfjiJ250ooaj8dT5X5CYPH4gOGqCXEbC2C8fDxpit71a+KCwcV E+DoUh8h4jxlAhL2dqDiaDt9FP5sGWS8CBjOis9bEvS6DNSmdB8tbydyrc0qKdJFIQ==

**CESAR MILLAN PACHECO | Fecha:2023-06-06 18:49:34 | Firmante**

Dpcit73LmJJoAuXIOQTIPcs6leao3V/hmGY1Wo9+cNAmx1YjPfstpKOYJDgP860WlvB3nKgyHUzS8Ch5rF6LJ/ojk8JxQhgwPFFch1gAx0flwN/trYDKYklogjr5jmKZOzfynEDyZiRr RfboqRfj6YcfhYIDDL9eeUqpljGIHbgDHGZqcr1AMWov8+1YHwKLGwMt3oFv+HurbFZdFypVX2M40J6K1/ufcSAPRYd2Wpx+CuP4FYA5G4WaszGaegvHOVmPPb+AaGMfmw7f4 ByPTSpilRW9od4ZROMj0X7uEadulkRm2pE/G7AOIzfeuPB/b90Jmat71F6XtNapXfi/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



UW3Z5QLFR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mkXEYj2LZeIhPuCuDLPr1aWtBtpz9Q2>

