

Evaluación farmacológica en dianas terapéuticas de diabetes tipo 2 e identificación de compuestos activos para el descubrimiento de potenciales fármacos a partir de plantas cubanas.

Janet Sánchez Calero¹: Licenciada en Bioquímica, Doctor en Ciencias, Investigador Auxiliar.

Evangelina Marrero Faz¹: Doctor en Medicina, Doctor en Ciencias de Segundo Nivel, Investigador Titular, Especialista de segundo grado en Farmacología

Alan Harvey²: Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, PhD, Professor.

Alexander Gray²: Licenciado en Ciencias Farmacéuticas, PhD, Professor.

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA.

²Strathclyde Institute for Pharmaceutical and biomedical Science, Glasgow, Scotland, UK.

E-mail: jsanchez@censa.edu.cu

RESUMEN

El presente trabajo es una contribución al descubrimiento de nuevos candidatos terapéuticos para la diabetes tipo 2 cuyo objetivo fue evaluar siete plantas medicinales cubanas: *Allophylus cominia* (L.) Sw, *Ocimum tenuiflorum*, *Persea americana* Mill, *Jatropha aethiopica*, *Momordica charantia* y *Sechium edule* (variedades verde y blanca), sobre dianas moleculares involucradas en la fisiopatología de la enfermedad: Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP-1B), Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV), captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1 en ausencia de insulina y en un cultivo primario de adipocitos de rata en presencia de insulina, como marcadores de la insulino resistencia e identificación de compuestos líderes, para seleccionar aquellas promisorias para el desarrollo de nuevos productos antidiabéticos. Se obtuvieron extractos acuosos y fracciones de cada una de las plantas en escala de polaridad. El efecto inhibitorio de la actividad enzimática y la captación intracelular de glucosa fueron evaluados en los blancos referidos. Además, se evaluó el efecto antioxidante sobre radicales DPPH y el estado REDOX celular, de importancia en la progresión de la enfermedad. Se identificaron los compuestos activos de las plantas promisorias por Resonancia Magnética Nuclear uni y bidimensional y por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas. Los mejores resultados fueron los obtenidos con *A cominia*, *P americana* y *O tenuiflorum* dado que mostraron un marcado efecto inhibitorio de PTP1B; estimularon la captación de glucosa intracelular y evidenciaron un potente efecto antioxidante. *A cominia* a su vez mostró un efecto inhibitorio sobre DPPIV y disminuyó la concentración efectiva media de insulina requerida para el transporte de glucosa al interior del adipocito. Se identificó la planta *A cominia* como la más promisorias y

se seleccionaron el extracto acuoso y dos de sus fracciones activas (AcF 6 y AcF 10) como candidatos terapéuticos al mostrar mejores resultados de forma integral. También se evaluó el efecto antiinflamatorio sobre la fosfolipasa A2 de secreción (FLA-2s) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) de un extracto de *A. cominia*, el que mostró un efecto inhibitor de esta última enzima. Para evidenciar la respuesta *in vivo* del extracto acuoso de *A. cominia* se utilizó un modelo roedor específico de diabetes tipo 2 (n-STZ) que permitió observar el efecto sobre la disminución de los niveles de glucemia hasta valores normales. Estos resultados sustentan, en parte, el mecanismo de acción molecular antidiabético de las plantas seleccionadas, con énfasis en *A. cominia* y refuerzan los estudios previos sobre esta planta refrendada en la Patente: Certificado No. 22 898. OCPI, Cuba No. 1001/2003. Aplicación PCT Internacional: PCT/CU 03/00008, obtenida en nuestro centro. Se identificaron como compuestos activos en las fracciones: *A. cominia* (F6), los flavonoides: mearnsitrina, quercitrina, quercetina-3-alósido y naringenina-7-glucósido; *A. cominia* (F10), los taninos: 3-O-metil ácido elágico-4-O-alfa-ramnopiranósido, chebulamina, galocatequina y [8,8'-bi-2H-1-benzopirano]-2,2'-diona,7-(acetiloxi)-3-[(2-oxo-2H-1-benzopirano-7-il)oxi]-7'-[(2,3,4-tri-O-acetil-6-deoxi-a-L-manopiranosil)oxi]-(S); *P. americana* (F10) también contenía taninos y en *O. tenuiflorum* (F2) se detectaron fenoles, terpenoides y ácidos grasos. La investigación aporta nuevos conocimientos sobre las propiedades antidiabéticas, al más alto nivel científico, de un grupo de plantas medicinales cubanas evaluadas sobre dianas terapéuticas moleculares de diabetes tipo 2, seleccionándose *A. cominia* como la más promisoría para continuar estudios como candidato a medicamento, todo lo cual abre nuevas perspectivas para el tratamiento de esta importante afección a partir de fuentes naturales nacionales. La investigación se desarrolló con la ejecución de varios proyectos nacionales e internacionales. Ha sido presentada en eventos internacionales. Cuenta con publicaciones de varios artículos científicos en revistas arbitradas de la especialidad. Fue objeto de dos Premios Provinciales en el 2013: CITMA y Relevante en el XVI Fórum de Ciencia y Técnica.

Palabras claves: Dianas terapéuticas de Diabetes tipo 2, inhibidores de PTP1B, inhibidores de DPPIV, captación de glucosa en adipocitos, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, modelo neonatal de diabetes tipo 2, actividad antidiabética, plantas medicinales cubanas, fitoquímica, RMN, HPLC, Espectrometría de Masas.

Introducción

La Diabetes mellitus (DM) es la más relevante y compleja enfermedad metabólica que afecta a un elevado número de personas en todo el mundo, incluyendo a los países en desarrollo. La diabetes tipo 2, la cual se caracteriza por la resistencia a la insulina, es la clase más

frecuente asociada con la obesidad, y representa del 90-95% de los casos, particularmente en Cuba representa la octava causa de muerte.¹ Existen esquemas terapéuticos oficiales emitidos por el MINSAP para el tratamiento de la DM tipo 2. No obstante, persisten en muchos casos problemas en el control de la glucemia en los mismos. De ahí la necesidad de la búsqueda de nuevos productos eficaces, seguros y asequibles a la población para el tratamiento de esta enfermedad, con énfasis en los de origen natural. Actualmente la comunidad internacional apunta hacia la búsqueda de inhibidores de las enzimas Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) y DipeptidilPeptidasa IV (DPPIV), las cuales constituyen dianas terapéuticas en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta dolencia.^{2,3}

En la actualidad existe un reconocimiento al empleo de fuentes naturales para la obtención de medicamentos y en especial la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, de eficacia y seguridad. Más de 800 plantas han sido identificadas como potenciales en el tratamiento de la DM, pero solamente unas pocas han sido evaluadas médica y científicamente para determinar su eficacia.

Objetivos

Evaluar sobre dianas terapéuticas de diabetes tipo 2 un grupo de plantas medicinales: *Allophylus cominia* (L.) Sw, *Ocimum tenuiflorum*, *Persea americana* Mill, *Jatropha aethiopica*, *Momordica charantia* y *Sechium edule* (variedades verde y blanca), algunas de ellas reportadas por la etnomedicina cubana como remedios antidiabéticos y seleccionar las más promisorias con vistas al futuro desarrollo de nuevos fitomedicamentos para el tratamiento de esta entidad, así como identificar en las mismas los compuestos activos responsables de este efecto farmacológico.

Diseño metodológico

Fraccionamiento de los extractos vegetales.

Se obtuvieron diez fracciones, a partir del fraccionamiento del extracto acuoso liofilizado usando una mezcla de solventes orgánicos, con incremento de la polaridad, hasta obtener 10 fracciones (F1-F10) por cada planta evaluada: n-hexano 100% (F1), 1,2 di-cloro-metano 100% (F2), 1,2 di-cloro-metano 75%: 2-butanol 25% (F3), 1,2 di-cloro-metano 50%: 2-butanol 50% (F4), 1,2 di-cloro-metano 25%: 2-butanol 75% (F5), 2-butanol 100% (F6), 2-butanol 75%: metanol 25% (F7), 2-butanol 50%: metanol 50% (F8), 2-butanol 25%: metanol 75% (F9) y metanol 50%: agua 50 % (F10).

Evaluación de las muestras obtenidas en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Se utilizaron modelos *in vitro* para la evaluación biológica de la actividad sobre los blancos estudiados: inhibición de PTP1B⁴ y DPPIV;⁵ captación de glucosa en adipocitos en línea celular 3T3-L1 en ausencia de insulina y en un cultivo primario de adipocitos de rata en presencia de insulina;⁶ efecto antioxidante sobre radicales DPPH⁷ y estado REDOX celular en fibroblastos L929.⁸ Así como se evaluó en el extracto acuoso de *A cominia* el efecto antiinflamatorio sobre la inhibición de la fosfolipasa A2 de secreción (FLA-2s)⁹ y la ciclooxigenasa-2 (COX-2)¹⁰ y el efecto antidiabético (glucosa plasmática) en un modelo *in vivo* roedor de diabetes tipo2 (n-STZ).¹¹ Todos métodos de actualidad en el tema.

Identificación de los compuestos activos de aquellas plantas promisorias.

Se utilizaron técnicas espectroscópicas de RMN uni y bidimensional, así como cromatografía CLAR (HPLC) acoplada a Espectrometría de Masas para dilucidar la estructura química de los compuestos activos.

Resultados

Evaluación de la actividad inhibidora de la enzima PTP1B.

Los extractos acuosos de las siete plantas estudiadas, mostraron en tres de ellas, una fuerte actividad inhibidora de la enzima PTP1B: *A cominia* (CI₅₀=2.3 µg/mL), *P americana* (CI₅₀=2.9 µg/mL) y *O tenuiflorum* (CI₅₀=38 µg/mL), exhibiendo un efecto dependiente de la concentración. La enzima PTP1B inhibe los mecanismos de transducción de señales involucrados en la activación del receptor de la insulina, por lo que este efecto constituye un aspecto muy importante que se traducirá en una mejora de la resistencia a la insulina que padecen los diabéticos tipo 2 y por lo tanto resultan candidatos terapéuticos promisorios para el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la misma.

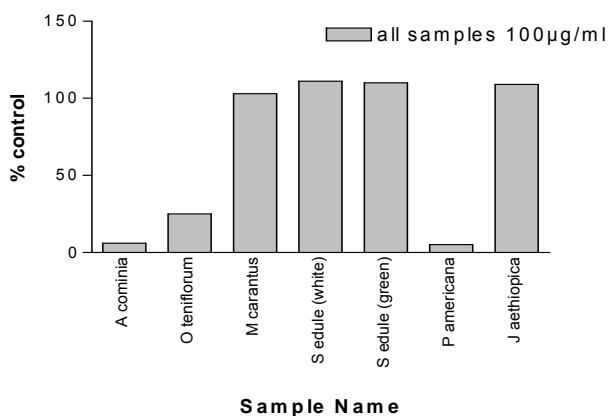


Figura 1: Pesquisaje de los extractos acuosos de siete plantas cubanas como inhibidores de PTP1B.

Del total de las 70 fracciones evaluadas, 14 de ellas mostraron también una potente actividad inhibidora de PTP1B, con los siguientes valores de porcentajes de inhibición: AcF6 (89.3%), AcF9 (90.7%), AcF10 (88.7%), OtF2 (94.2%), PaF3 (98.9%), PaF4 (89.7%), PaF6 (99.3%), PaF7 (95.5%), PaF8 (89.0%), PaF9 (96.2%), PaF10 (95.1%), SegF2 (91.0%), SewF2 (94.0%), SewF3 (89.2%). Tres de ellas evidenciaron mayor actividad inhibidora de PTP1B, en relación a la concentración requerida con los siguientes valores de CI_{50} : AcF9 (4.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AcF10 (3.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y PaF10 (3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Determinación de la actividad inhibidora de la enzima DPPIV.

Se evidenció una moderada actividad inhibidora de la enzima DPPIV por parte de la especie *A cominia* ($CI_{50}=218.6 \mu\text{g}/\text{mL}$), exhibiendo un efecto dependiente de la concentración. La fracción AcF6 fue la que resultó más activa, mostrando un porcentaje de inhibición del 52.0%. La enzima DPPIV es una proteasa que se libera en el intestino en respuesta a la ingestión de alimentos e hidroliza las hormonas incretinas responsables de mantener la homeostasis de la glucosa regulando la secreción de las hormonas pancreáticas insulina y glucagón, por tanto los inhibidores de la misma constituyen candidatos terapéuticos promisorios para el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

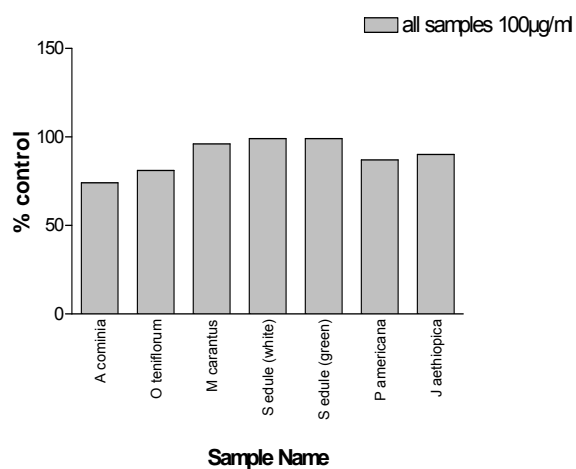


Figura 2: Pesquisaje de los extractos acuosos de siete plantas cubanas como inhibidores de DPPIV.

Evaluación de la actividad de captación de glucosa en adipocitos de la línea celular 3T3-L1 en ausencia de insulina.

De los extractos acuosos de las siete plantas evaluadas, tres de ellos, exhibieron un aumento significativo de la captación de glucosa en adipocitos de la línea celular 3T3-L1, en ausencia de insulina. Los valores de los porcentajes de incremento de entrada de glucosa a la célula adiposa sobre el control fueron: *P americana* (191%), *A cominia* (161%), y *O tenuiflorum* (139%). Así mismo, de las 70 fracciones evaluadas, tres de ellas exhibieron una potente estimulación de la captación intracelular de glucosa en adipocitos,

mostrando los siguientes porcentajes de incremento de entrada de glucosa a la célula adiposa sobre el control: AcF10 (341%), AcF6 (315%) y PaF10 (257%).

Estos resultados indican que los extractos vegetales activos en este ensayo estimulan el transporte de la glucosa al interior celular, permitiendo su utilización como fuente de energía de los organismos vivos y disminuyendo las consecuencias indeseables de la hiperglicemia, todo lo cual contribuye en su conjunto a mantener la homeostasis de este azúcar en el organismo y a que cumpla las importantes funciones metabólicas de las cuales es responsable.

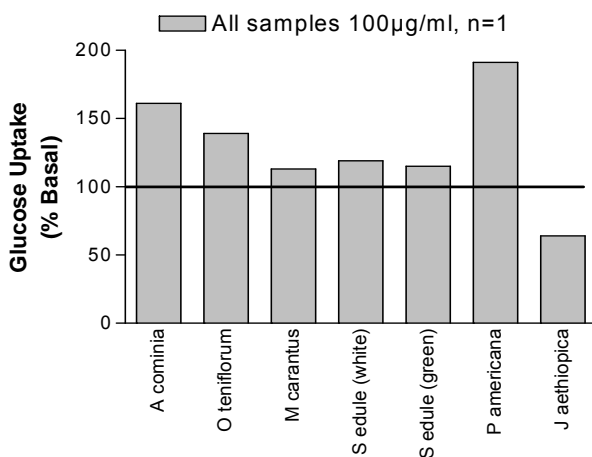


Figura 3: Efecto del extracto acuoso de las siete plantas cubanas sobre la captación de glucosa en adipocitos 3T3-L1.

Evaluación de la actividad antioxidante a nivel de reacciones químicas y celular.

Evaluación de la actividad antioxidante a nivel de reacciones químicas.

De los siete extractos vegetales estudiados, tres de ellos mostraron una potente actividad antioxidantea través del secuestro de radicales DPPH, lo cual evidencia sus propiedades reductoras. Los valores de los porcentajes de inhibición en la producción de radicales DPPH a una concentración final de 100 µg/mL fueron: *O tenuiflorum* (94 %), *P americana* (94 %) y *A cominia* (83 %).

De las 70 fracciones evaluadas, 12 de ellas mostraron una potente actividad antioxidante a través del secuestro de radicales DPPH, con los siguientes valores de porcentajes de inhibición en la generación de esta especie radicalaria: AcF1 (94.4%), AcF3 (97.3%), AcF6 (100%), AcF7 (100%), AcF8 (100%), AcF9 (100%), AcF10 (100%), OtF8 (91.6%), OtF9 (86.6%), OtF10 (88.4%), PaF9 (100%) y PaF10 (100%).

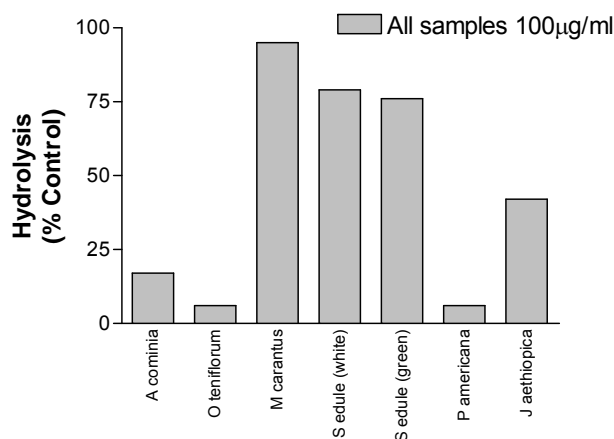


Figura 4: Pesquisaje de los extractos acuosos de las plantas cubanas con actividad antioxidante mediante el ensayo del DPPH.

Evaluación de la actividad antioxidante a nivel celular.

Los siete extractos vegetales estudiados mostraron una potente actividad antioxidante a través de la reducción del estrés oxidativo intracelular en fibroblastos de la línea celular L929. Los valores de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del daño oxidativo celular fueron: *P americana* (0.19 µg/mL), *A cominia* (0.43 µg/mL) y *O tenuiflorum* (0.66 µg/mL).

De las 70 fracciones evaluadas, 12 de ellas mostraron una potente actividad antioxidante a través de la reducción del estrés oxidativo intracelular en fibroblastos, con los siguientes valores de porcentajes de inhibición: AcF6 (85.8%), AcF7 (96.3%), AcF8 (95.9%), AcF9 (85.5%), AcF10 (79.5%), OtF8 (100%), OtF7 (99.5%), OtF9 (100%), OtF10 (80.9%), PaF6 (93.5%), PaF8 (81.7%), PaF10 (67.8%). Se conoce que el estrés oxidativo es uno de los factores que interviene en la progresión de las complicaciones de esta enfermedad por lo que este efecto antioxidante encontrado en el presente estudio le brinda efectos farmacológicos adicionales promisorios los que redundarán en la calidad de vida de los pacientes diabéticos.

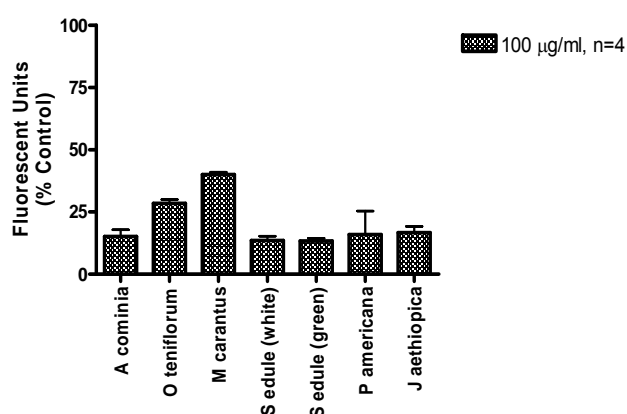


Figura 5: Pesquisaje de los extractos acuosos de las plantas cubanas con actividad antioxidante en fibroblastos L929 mediante el ensayo de la di-cloro-fluoresceína.

Evaluación de la actividad de captación de glucosa del extracto acuoso de *A cominia* en un cultivo primario de adipocitos de rata en presencia de insulina.

El extracto acuoso de *A. cominia* disminuyó la resistencia a la insulina, incrementando la captación de glucosa en la célula adiposa con respecto al efecto en presencia de insulina solamente, a la vez que disminuyó la concentración efectiva media (CE₅₀) de insulina, indicada en el gráfico por las líneas discontinuas, requerida para que tenga lugar el transporte de glucosa en los adipocitos, lo cual indica que este extracto mimetiza la acción de la insulina.

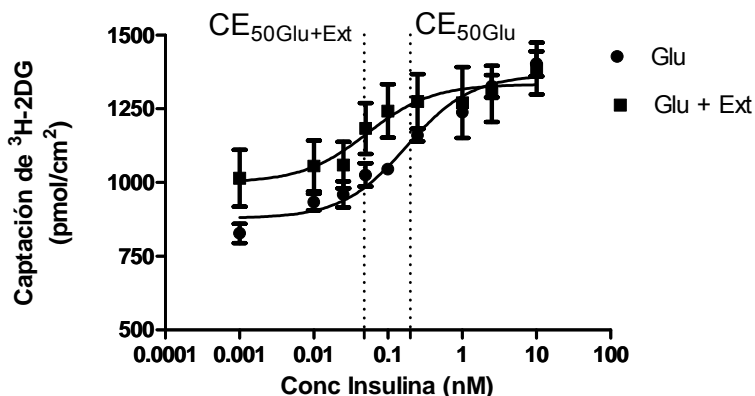


Figura 6: Efecto del extracto acuoso de *A. cominia* sobre la captación de glucosa en adipocitos de rata tratados con diferentes concentraciones de insulina (n=6). Los resultados están expresados como media ± EEM.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *A. cominia* sobre las enzimas FLA₂ y COX-2.

El extracto clorofórmico de *A. cominia*, a una concentración final de 100 µg/mL, mostró una potente actividad antiinflamatoria, evidenciado por la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) en un 80%. En la fisiopatología de la Diabetes mellitus tipo 2, se presenta un estado inflamatorio crónico, por tanto los compuestos con actividad antiinflamatoria contribuyen positivamente a mitigar las complicaciones asociadas a esta enfermedad.

Tabla 1. Actividad inhibitoria de COX-2 y FLA-2s del extracto clorofórmico de hojas de *Allophylus cominia*(L) Sw.

Tratamiento	Inhibición COX-2 (%) (100µg/ml)	Inhibición FLA-2s IC ₅₀ (mg/ml)
Extracto clorofórmico <i>A. cominia</i>	80	--

Determinación de la actividad antidiabética del extracto acuoso de *A cominia* en un modelo roedor in vivo de diabetes tipo 2.

Se demostró científicamente que el extracto acuoso de *A cominia* (L.) Sw disminuye los niveles plasmáticos de glucosa en un modelo experimental específico desarrollado en ratas diabéticas tipo 2 (n-STZ). La administración oral diaria del mismo en tres dosis diferentes (0.25, 0.5 y 1.0 g/kg) durante 21 días a los animales diabéticos redujo significativamente las concentraciones de glucosa en sangre con respecto al grupo diabético sin tratamiento. El empleo de las dos dosis superiores permitió restablecer los valores glicémicos normales.

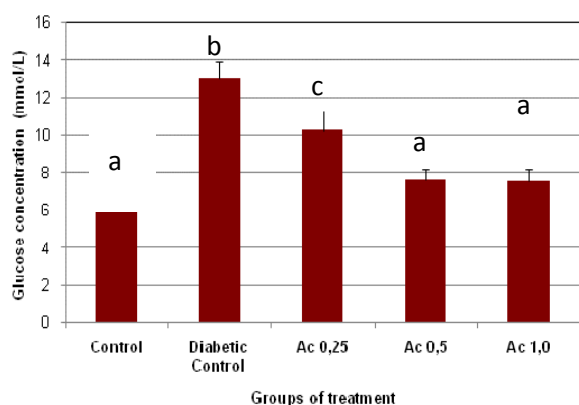


Figura 7: Efecto de la administración reiterada del extracto acuoso de hojas de *A cominia* sobre la concentración de glucosa en sangre en un modelo de ratas diabéticas tipo 2. Los datos son expresados como la media \pm EEM de 7 animales por grupo. Letras diferentes representan diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). Grupo control: animales normales tratados con buffer citrato; control diabético: animales diabéticos tipo 2 tratados con estreptozotocina a los 2 días de nacidos; grupos Ac: animales diabéticos tratados con diferentes dosis del extracto de *A cominia* (0.25, 0.5 y 1.0 g/kg).

Identificación de la estructura química de los compuestos responsables de la actividad antidiabética en las fracciones activas.

El análisis integral de los diferentes espectros obtenidos por RMN y espectrometría de masas acoplada a HPLC, permitió identificar como compuestos activos en las fracciones: *A cominia* (F6) los flavonoides: Mearnsitrina (A), Quercitrina (B), Quercetina-3-alósido y Naringenina-7-glucósido (C), *A cominia*(F10), los taninos: 3-O-metil ácido elágico-4-O-alfa-ramnopiranosido (fórmula molecular: $C_{21}H_{28}O_3$ y masa molecular: 463.0888 g/mol), chebulamina ($C_{27}H_{24}O_{19}$ y 652.1330 g/mol), galocatequina ($C_{37}H_{29}O_{17}$ y 745.1410 g/mol) y [8,8'-bi-2H-1-benzopirano]-2,2'-diona, 7-(acetiloxi)-3-[(2-oxo-2H-1-benzopirano-7-il)oxi]-7'-[(2,3,4-tri-O-acetil-6-deoxi-a-L-manopiranosil)oxi]- (S) ($C_{41}H_{32}O_{17}$ y 796.1645 g/mol); P

americana (F10) también contiene taninos y en *O tenuiflorum* (F2) se detectaron fenoles, terpenoides y ácidos grasos.

Discusión

Los resultados del presente trabajo mostraron que de las siete plantas estudiadas, las tres plantas seleccionadas como promisorias, *Allophylus cominia* (L.) Sw, *Persea americana* Mill y *Ocimum tenuiflorum*, inhibieron la actividad enzimática de PTP1B, estimularon la captación de glucosa en la célula adiposa y mostraron propiedades antioxidantes. *Allophylus cominia* (L.) Sw seleccionada como la planta candidata, también inhibió la actividad de la enzima DPPIV, disminuyó la concentración efectiva media de insulina requerida para el transporte de glucosa en la célula adiposa, disminuyó los niveles plasmáticos de glucosa hasta valores normales en un modelo *in vivo* de diabetes tipo 2 y mostró propiedades antiinflamatorias. En la planta *A cominia*, los compuestos responsables del efecto antidiabético, fueron los flavonoides identificados en la fracción 6 y los taninos presentes en la fracción 10, este último grupo de compuesto también estuvo presente en la fracción 10 de *P americana* y en la planta *O tenuiflorum* estos efectos están asociados a la presencia de fenoles, terpenoides y ácidos grasos, compuestos detectados en la fracción 2. En correspondencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la literatura científica refiere que estos compuestos activos identificados en las plantas promisorias tienen propiedades antidiabéticas. Así varios trabajos informan que diferentes tipos de compuestos muestran actividad inhibidora de PTP1B: los flavonoides quercitrina y norbergenina y el ácido graso, ácido oleanólico, aislados de la planta *Ardisia japonica*,¹² tres compuestos diterpenos obtenidos del extracto metanólico de las raíces de *Salvia miltiorrhiza*¹³ y triterpenos aislados del extracto metanólico de hojas de *Diospyros kaki* (Persimmon).¹⁴ Varios trabajos describen que los taninos y flavonoides tienen propiedades antidiabéticas por incrementar la captación de glucosa mediante la inducción de la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) desde el compartimiento intracelular a la membrana plasmática.¹⁵⁻¹⁷ Los flavonoides presentes en la fracción 6 de *A cominia* son los responsables del efecto inhibitorio de DPPIV, otros trabajos describen este efecto para este tipo de compuestos en otros extractos vegetales.¹⁸ La integración de los resultados obtenidos con la planta *A cominia* indican que el efecto hipoglicemiante observado con el extracto acuoso de hojas de esta planta en un modelo *in vivo* de diabetes tipo 2 está mediado por la inhibición de las enzimas PTP1B y DPPIV y la habilidad para estimular la entrada de glucosa a la célula adiposa en ausencia y presencia de insulina, todo lo cual disminuye la resistencia a la insulina y por tanto la hiperglicemia que caracteriza a la diabetes tipo 2. A su vez, las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias mostradas por este extracto también contribuyen positivamente a disminuir

el estrés oxidativo y la inflamación crónica, ambos fenómenos presentes en la fisiopatología de esta enfermedad. De ahí que se seleccione a *A cominia*, como un candidato novedoso promisorio para el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 a partir de fuentes naturales.

Conclusiones

Las evaluaciones farmacológicas moleculares de siete plantas cubanas con potencialidad antidiabética sobre blancos terapéuticos relevantes de la diabetes tipo 2, permitieron seleccionar a *Allophylus cominia* (L.) Sw, *Persea americana* Mill y *Ocimum tenuiflorum* como las plantas más promisorias y a *Allophylus cominia* (L.) Sw como la planta candidata para continuar estudios para el desarrollo de futuros medicamentos antidiabéticos, a la vez que se identificaron algunos de los principales compuestos responsables de este efecto farmacológico.

Recomendaciones

Recomendamos la continuidad de los estudios con el extracto acuoso de las hojas de la planta *Allophylus cominia* (L.) Sw o sus constituyentes activos, para el desarrollo de fitofármacos, como una medicina natural alternativa, para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Referencias bibliográficas

1. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Anuario Estadístico de Salud de Cuba. 2012:34.
2. Teng BS, Wang CD, Yang HJ, Wu JS, Zhang D, Zheng M, Fan ZH, Pan D and Zhou P. A Protein Tyrosine Phosphatase 1B activity inhibitor from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst and its hypoglycemic potency on streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. J Agric Food Chem. 2011;59:6492-500.
3. Havale SH, Pal M. Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 for the treatment of type 2 diabetes. Bioorg Med Chem. 2009;17:1783-1802.
4. Montalibet J, Skorey KI & Kennedy BP. Protein tyrosine phosphatase: enzymatic assays. Methods. 2005;35:2-8.
5. Cooper KG and Woods JP. Secreted Dipeptidyl Peptidase IV activity in the dimorphic fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 2009;77:2447-54.
6. Lakshmanan J, Elmendorf JS, Özcan S. Analysis of Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes. Diabetes Methods Mol Biol. 2003;83:97-103.

7. Cheng Z, Moore J and Yu L. High-Throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *J Agric Food Chem.* 2006;54(20):7429–36.
8. Wang H and Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(5/6):612–6.
9. Payá M, Terencio MC, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Involvement of secretory phospholipase A2 activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol.* 1996;117:1773-9.
10. Abad MJ, De las Heras B, Silvan AM, Pascual R, Bermejo P, Rodríguez AM, Villar AJ. Effects of furocoumarins from *Cachrys trifida* on some macrophage functions. *Pharm Pharmacol.* 2001;53:1163-8.
11. Permutt MA, Kakita K, Malinas P, Karl I, BonnerWeir S, Weir G, Giddings SJ. An *in vivo* analysis of pancreatic protein and insulin biosynthesis in a rat model for non-insulindependent diabetes. *J Clin Invest.* 1984;73:1344-50.
12. Yan-Fang L, Li-Hong H, Feng-Chang L, Jia L & Qiang S. PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*. *J Asian Nat Prod Res.* 2005;7:13-8.
13. Yu H, Hyuncheol O, Minkyun N, Beom K, Won O, Bo K, Dae J, Seong R, Dai S and Jong A. PTP1B inhibitory effect of Abietane Diterpenes isolated from *Salvia miltiorrhiza*. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:1795-7.
14. Thuong PT, Lee CH, Dao TT, Nguyen PH, Kim WG, Lee SJ, Oh WK. Triterpenoids from the leaves of *Diospyros kaki* (persimmon) and their inhibitory effects on protein tyrosine phosphatase 1B. *J Nat Prod.* 2008;71:1775-8.
15. Prasad CNV, Anjana T, Banerji A, Gopalakrishnapillai A. Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. *FEBS Lett* 2010;584(3):531-6.
16. Zhang ZF, Li Q, Liang J, Dai XQ, Ding Y, Wang JB, Li Y. Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition. *Phytomedicine.* 2010;17:14-8.
17. Minakawa M, Miura Y, Yagasaki K. Piceatannol, a resveratrol derivative, promotes glucose uptake through glucose transporter 4 translocation to plasma membrane in L6 myocytes and suppresses blood glucose levels in type 2 diabetic model db/db mice. *Biochem Bioph Res Co.* 2012;422(3):469-75.
18. Pannakal ST. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol.* 2011;63:203-6.