

Fecha de recepción: 21-noviembre-2023

Fecha de aceptación: 8-noviembre-2024

ACTIVIDAD BIOLÓGICA POTENCIAL DEL ALACHE (*Anoda cristata* (L.) SCHLTDL.)

Aurea Raquel González Macías¹, Isabel Gracia Mora², Marisol Rivera Huerta², Francisco Sánchez Bartz² y María Amanda Gálvez Mariscal^{3*}

¹Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Conjunto "E". Circuito de la Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 04510. CdMx, México.

²Unidad de Investigación Preclínica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Conjunto "E". Circuito de la Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 04510. CdMx, México.

³Departamento de Alimentos y Biotecnología. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Lab. 312. Conjunto "E". Circuito de la Investigación Científica s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 04510. CdMx, México.

*Correo: galvez@unam.mx

RESUMEN

Anoda cristata (alache) es un quelite mexicano, tolerado en los sistemas agrícolas de pequeños productores, es considerado como un recurso subutilizado. Posee, como algunas malváceas, familia a la que pertenece, un mucílago contenido en el caldo que se estudió para conocer su efecto sobre la absorción de glucosa y de lípidos en un modelo murino alimentado con una dieta alta en grasa y que bebió, durante todo el estudio, agua azucarada imitando un refresco. Este grupo se comparó con un grupo tratado con metformina. Se evaluaron los niveles de glucosa en sangre, hemoglobina glicosilada y parámetros que indican lipemias. Además, se hicieron revisiones histológicas *post mortem* del hígado. Los resultados indicaron que el caldo de una preparación culinaria tradicional de alaches, que contiene además del polisacárido viscoso una serie de fitocompuestos no identificados del todo, produjo en los animales con intolerancia a la glucosa un efecto similar al obtenido con metformina. Aunque causó una ligera elevación de las lipoproteínas de baja y alta densidad y logró mantener niveles apropiados de colesterol total, triglicéridos, glucosa y hemoglobina glicosilada. No hubo lesiones macroscópicas en los órganos; sólo el hígado presentó niveles entre leves y moderados de esteatosis, sin hallazgos bioquímicos de un daño mayor, o indicios de daño en otros órganos. La conclusión del estudio fue que el caldo viscoso de la sopa tradicional de alaches en los animales alimentados con una dieta alta en grasa y agua azucarada logró mantener los niveles de glucosa en sangre, similar a los efectos en los animales tratados con metformina, y mantuvo otros parámetros bioquímicos en intervalos normales. Esto permite proponer que *Anoda cristata* sea incluida en diversos alimentos y se aumente su consumo, especialmente para pacientes intolerantes a la glucosa.

PALABRAS CLAVE: alaches, dieta alta en grasa, hipoglucemiante, caldo viscoso, plantas subutilizadas.

POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALACHE (*Anoda cristata* (L.) Schldl.)

ABSTRACT

Anoda cristata (alache) is a Mexican “*quelite*” tolerated in small producers’ agri-systems, considered an underutilized plant resource. It produces a mucilage like some plants of the Malvaceae family to which *alaches* belong. The broth of a culinary preparation of alaches containing this mucilage was studied to know its effect on glucose absorption and lipids metabolism in a murine model fed on a high-fat diet, drinking sweetened water at a level similar to soft drinks, during all the study, comparing it to a group treated with metformin. Blood glucose, glycosylated hemoglobin levels, and parameters indicating lipemia were evaluated. Besides, a *postmortem* histological revision was performed to know the possibility of steatosis. Results indicated that the broth of a traditional culinary preparation containing, besides the viscous polysaccharide, a series of phytochemicals not completely identified, produced on the animals showing glucose intolerance a similar effect to metformin intake. Even though it produced a slight increase of low and high density lipoproteins, it kept appropriate cholesterol, triglycerides, plasma glucose and glycosylated hemoglobin levels. No macroscopic lesions were found; only the liver showed steatosis at levels low to moderate. No biochemical signs of further damage were found. Other organs inspected did not indicate any damage. The conclusion was that the viscous broth of the traditional *alaches* soup was able to maintain glucose levels at normal intervals in animals fed on a high-fat diet plus sugared water, like the effects observed in the group treated with metformin and was able to keep other biochemical parameters at normal levels. This allows to propose the inclusion of *Anoda cristata* on several foods and increase its consumption especially for patients suffering from glucose intolerance.

KEYWORDS: alaches, high-fat diet, hypoglucemiant, viscous broth, underutilized plant.

INTRODUCCIÓN

México es un país con una amplia biodiversidad. Se estima que de las 25,000 especies de plantas superiores con las que cuenta, alrededor de 500 son consideradas quelites (Linares y Bye, 2015).

Quelite es el nombre náhuatl que designa a las plantas tiernas comestibles. Los quelites se definen como: plantas cuyas hojas, tallos tiernos y en ocasiones inflorescencias inmaduras se consumen como verdura. No se cultivan a gran escala ni de manera expresa (salvo ciertos casos), pues generalmente crecen al interior de sistemas agrícolas de mayor importancia económica como el del maíz, frijol, calabaza o chile; los quelites tienen importancia a nivel gastronómico y nutricional por su contribución con aromas, colores y sabores a los platillos, además de proporcionar fibra, vitaminas, minerales y fitoquímicos diversos (Castro *et al.*, 2011).

El alache (*Anoda cristata*) (Figura 1) es un quelite nativo de México, utilizado en diversas comunidades indígenas, principalmente de la zona centro-sur. Es usualmente consumido en la época de lluvia, cuando se cosechan las hojas cortando cerca de la base, eligiendo a las plantas jóvenes con hojas suaves (Rendón *et al.*, 2001).

La forma tradicional de consumirla en el Estado de México involucra la preparación de una de sopa caldosa con ½ kg de las hojas separadas de los tallos que se lavan con agua limpia; en una olla con 1.5L de agua y aproximadamente 50 mL de agua donde se ha disuelto ½ cucharadita del *tequesquite* blanco (sin el precipitado insoluble) se dejan hervir con agitación constante, hasta que las hojas se ablanden y se libere un mucílago, lo que le da un aspecto viscoso (Linares *et al.*, 2017). También en las comunidades indígenas usan la flor para hacer una infusión para el alivio de la tos, o consumen la sopa, en especial cuando una persona tiene elevados los niveles



Figura 1. Flor y hojas de *Anoda cristata* (L.) Schld. Foto: Edelmira Linares

de azúcar en sangre, de acuerdo con la costumbre popular (comunicación personal Dra. E. Linares).

En experimentos previos se reportó la presencia de dos flavonas: acacetina y diosmetina (Juárez-Reyes, 2016). Estas flavonas se ha demostrado que actúan como sustratos o inhibidores de diferentes enzimas CYP (citocromo P450) y que en casos de cáncer podrían estar participando en la inhibición del crecimiento tumoral (Doostdar *et al.*, 2000). También se ha demostrado que estas flavonas disminuyen el nivel de glucosa en sangre en un modelo animal de ratas con hiperglucemia, así como también disminuyen los niveles de colesterol y triglicéridos (TG) en estos animales, determinándose que los extractos de diosmetina y acacetina son insulino-trópicos y antihiperglucémicos (Juárez-Reyes *et al.*, 2015).

Se sabe que algunas plantas de la familia Malvaceae, a la que pertenece *Anoda cristata*, poseen depósitos abundantes de mucílago en los idioblastos, conductos de mucílago, cavidades y células epiteliales especializadas. En el caso de *Malva sylvestris* L. la concentración reportada en hojas es 6.0-7.2%, en flores 3.8-7.3% y en raíces 7.5%, en base seca. Las unidades repetitivas identificadas en el polisacárido de *M. sylvestris* son: ácido glucurónico, ramnosa, galactosa, fructosa, glucosa y trehalosa y a principios de la década de los 90's se propuso una estructura: (1→4)-[O-β-(D-glucopiranosil ácido urónico)-(1-3)]-O-α-(D-galactopiranosil ácido urónico)-(1→2)-O-α-L-ramnopiranosil + residuo (1→2) unido α-ramnopiranosil ramnopiranosil, unidades en la cadena central (Tomoda *et al.*, 1989; Gasparetto *et al.*, 2011). Lo anterior queda ejemplificado en la Figura 2.

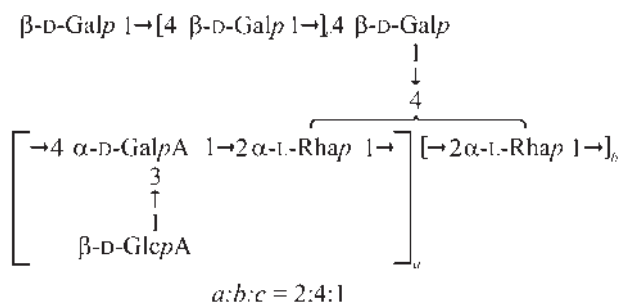


Figura 2. Estructura propuesta del mucílago de *M. sylvestris*. Fuente: Tomoda *et al.*, 1989.

En México, *Anoda cristata* tiene uso medicinal y culinario desde tiempos prehispánicos (Ramos Mora, 1989; Shamosh, 2014), sin embargo, el desconocimiento de esta especie por la comunidad científica no le ha otorgado el reconocimiento con que cuenta *Malva sylvestris*. Puede suponerse que el mucílago, un polisacárido clasificado como fibra soluble (Campos-Vega y Oomah, 2013), tenga una composición y estructura semejante a lo descrito anteriormente para malva, ya que *A. cristata* pertenece a la misma familia que *M. sylvestris*, planta utilizada para el alivio de diversos padecimientos y que ha sido estudiada ampliamente en la India y en Brasil (Ahmed *et al.*, 2011; Gasparetto *et al.*, 2011).

El mucílago de alaches, precipitado con etanol al 50% es un polisacárido de aproximadamente de 1500 Da (datos preliminares del Lab. 312 de Facultad de Química, UNAM). Los mecanismos que pueden explicar los efectos benéficos de consumir especies como los alaches, podrían ser, como lo publicó el grupo de la Dra. Urooj los siguientes:

- a) La adsorción de la glucosa, presente en el tracto gastrointestinal, a la fibra soluble e insoluble de los alaches.
- b) Un efecto de retardo en la velocidad de difusión de la glucosa a las células intestinales por efecto de la misma fibra y el polisacárido.
- c) Una tercera posibilidad es que los carbohidratos de las plantas sean capaces de inhibir la actividad de las amilasas sobre el almidón de la dieta (Ahmed *et al.*, 2011; Devi & Urooj, 2015).

Un efecto adicional puede ser atribuido a los fitoquímicos y las sustancias biológicamente activas que se encuentran en esta planta, no considerados como nutrimentos. El alache, además de producir mucílago cuenta con una variedad de fitocompuestos, entre los que se encuentran las flavonas, mencionadas arriba (Juárez-Reyes, 2016) (Figura 3).

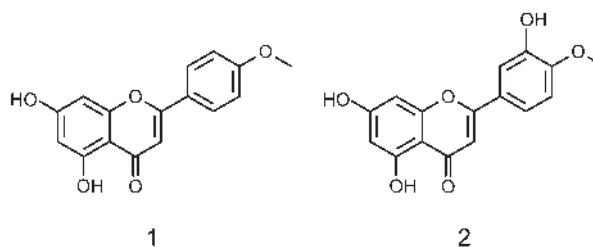


Figura 3. Estructura química de (1) acacetina y (2) diosmetina. Fuente: Juárez-Reyes *et al.*, 2015.

En el proyecto CONACYT 214286 “Rescate de especies subvaloradas de la dieta tradicional mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, se propuso que el impacto en algunos parámetros bioquímicos, como una disminución de la concentración de glucosa en sangre, posterior al consumo del platillo preparado, en este caso con alaches, se debía al conjunto de compuestos presentes en *Anoda cristata*, por lo que se trabajó en ese estudio con su preparación culinaria (Morales-Guerrero *et al.*, 2023), generando los datos correspondientes al índice glucémico (I.G.) de arroz blanco y de arroz adicionado de alaches, lo que permite disminuir su clasificación de alto a medio (72.4 ± 15.6 a 67.5 ± 11.7), respectivamente. Una de las desventajas del trabajo con quelites es que son plantas altamente perecederas, además de ser plantas de temporal, y en este estudio se decidió trabajar con el caldo obtenido de la sopa de alaches frescos. En el laboratorio se obtuvo también el caldo viscoso de las hojas de alache secas, con vistas a una posible aplicación comercial; de ambas formas (hojas frescas u hojas secas) se obtiene el caldo viscoso.

Por otro lado, es importante recordar que México se posiciona dentro de los primeros lugares a nivel mundial en obesidad de adultos e infantil, así como en enfermedades cardiovasculares, diabetes e hipertensión

por su alta incidencia en la población (WHO, 2022). Con datos publicados por la Encuesta Nacional de Nutrición de México (Shamah-Levy *et al.*, 2020), en México se registra el mayor número de fallecimientos por diabetes en Latinoamérica: cerca del 13% de los decesos en el país se deben a esta enfermedad que, en el 2021, ascendió a 140,729 de acuerdo con las Estadísticas de Defunciones Registradas (INEGI, 2022). La diabetes mellitus (DM), se define como una enfermedad progresiva crónica; la constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de los hidratos de carbono, que alteran también al metabolismo lipídico y proteico. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que es la más frecuente, se caracteriza por la dependencia de insulina, ya que las células del páncreas no producen la suficiente para mover la cantidad de glucosa del torrente sanguíneo a las células. Esto genera daño vascular y complicaciones que se presentan a largo plazo, tales como: insuficiencia renal, daño a la retina, entre otras (Dávila-Torres *et al.*, 2015).

Este trabajo se centró en revalorizar el platillo que se consume en Ozumba, Estado de México y sus alrededores, como parte de la tradición culinaria, por lo que el objetivo fue obtener información del efecto del consumo del caldo de alache de una receta tradicional de Ozumba, Edo. de México sobre el peso de los animales de laboratorio, sus niveles de glucosa en sangre, así como analizar sus efectos sobre la bioquímica sanguínea (colesterol, TG, HDL, LDL, Hemoglobina glicosilada) e histología, en un modelo murino alimentado con una dieta alta en grasa y azúcares, a diferencia del trabajo de Juárez *et al.* (2015) y (2016), en el que se analizaron extractos de la planta en ratas tratadas con estreptozotocina para dañar su páncreas y evitar la producción de insulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Análisis por GC-MS. Para la derivatización de la muestra, se tomaron 100 μL del caldo de alaches proporcionado al laboratorio de la Red de Apoyo a la Investigación UNAM - INCMNSZ, que fueron extraídos con 600 μL de una mezcla metanol - cloroformo 3:1 (ambos solventes grado HPLC

de la marca Tecsiqum y Fermont, respectivamente). Se incubaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos y posteriormente se centrifugaron por 20 min a 15000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se tomó el sobrenadante y utilizando el sistema Speedvac (Thermo Scientific modelo SPD 121P) se concentraron hasta **deseccación** completa. Al extracto se añadieron 80 μL de clorhidrato de metoxiamina (Sigma-Aldrich) disuelto en piridina (20 mg/mL) y se incubó durante 90 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se añadieron 80 μL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MBSTFA, Sigma-Aldrich) 1% de clorotrimetilsilano (TMCS) y se incubó durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se inyectó 1 μL de la mezcla anterior en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS modelo 5977A/7890B) de la marca Agilent, con una columna Agilent HP5MS (30 m x 250 μm x 0.25 μm). La fase móvil fue helio al 99.9999% de pureza. El equipo fue calibrado con un estándar de perfluorotributilamina (PFTBA) de la marca Agilent.

Se realizó un análisis tipo no dirigido (untargeted) con un rango de adquisición de 50 a 600 Da con una energía de ionización de 70 eV. Se utilizó una velocidad de escaneo de 3 scan/s con un escaneo digital de 20 Hz. para llevar a cabo la corrida cromatográfica y la detección por espectrometría de masas. Enseguida se mencionan las condiciones del análisis: temperatura de entrada $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura del cuadrupolo $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de la fuente: $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, velocidad de flujo 1 mL/min, sistema de inyección: automático G4513A, tipo de inyección: estándar, volumen de inyección 1 μL , split: 1/30.

La corrida cromatográfica fue de 37 minutos totales y consistió en el siguiente programa de temperaturas: temperatura: $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, tiempo mantenido 1 min, tiempo de corrida 1 min. Una vez obtenidos los datos cromatográficos, se utilizó el software mzMine 2.54 para realizar el proceso de deconvolución y alineamiento. Se obtuvieron los datos de tiempo de retención y altura de pico. La identificación de los metabolitos se realizó mediante la librería NIST 2.0 (NIST Mass Spectral Library). Un valor de probabilidad $>70\%$ y de Match y Reverse Match >700 suponen una identificación correcta.

En este trabajo se presentan sólo los resultados cualitativos preliminares de la inyección de una muestra después de intentar filtrarla con un cartucho de 0.45 micrones para esterilizarla, aunque resultó muy difícil obtener el filtrado por la viscosidad del extracto.

Preparación del caldo para el análisis con animales

de laboratorio. El caldo de alaches administrado a los animales de laboratorio se obtuvo de una preparación culinaria, hecha con la receta arriba descrita (Linares *et al.*, 2017). La preparación culinaria (hojas y caldo) se dividió en porciones individuales y fue mantenida en congelación a -20°C hasta el momento de su utilización. Llegado el momento se descongeló una porción y fue centrifugada (8 500 rpm/ 4°C/ 20 min) con la finalidad de separar el caldo de las hojas. La fracción líquida, se esterilizó en autoclave (121 °C/ 15 min) y se guardó en alícuotas de 15 mL en refrigeración hasta el momento de su uso. Los sólidos totales se midieron tomando una alícuota de 1 mL de caldo, y llevándola a sequedad (65 °C/ 5 h). Los sólidos totales contenidos en el caldo se calcularon por diferencia de peso; a partir de este dato se hicieron los cálculos para su uso en el experimento.

Modelo murino. Se emplearon ratones de la cepa C57BL/6NHsd hembras (3-7 semanas de edad) obtenidas de Envigo® México, bajo la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química (OFICIO/FQ/CICUAL/238/17) y del protocolo preclínico

FPP-UNAM-UNIPREC-01y el Procedimiento normalizado de operación para el manejo de animales PNOMA-UNAM-UNIPREC-01, con la solicitud UNIPREC/17/016 para el desarrollo de este experimento. Los animales fueron numerados e identificados por medio de muescas en las orejas y divididos de manera aleatoria en cuatro grupos.

De acuerdo con el diseño experimental (Figura 4), a una cuarta parte de la población (n=8) se les administró una dieta de mantenimiento para roedores y agua simple purificada con luz UV (2018S Teklad Global Diets, Envigo USA) considerado como el grupo control (CNT); a los animales restantes se les administró una dieta alta en grasa (Tso's High fat diet, Global Diets, Envigo USA) y agua purificada con UV con azúcar al 12% durante 24 semanas para inducirles un estado de enfermedad asociado a la dieta. El contenido de lípidos fue de 6.3 g/100g en la dieta de mantenimiento vs. 19.78 g/100g para la dieta alta en grasa.

Una vez alcanzadas las 24 semanas con dieta alta en grasa y azúcar en el agua de bebida, los animales se dividieron de manera aleatoria en tres grupos experimentales (n=8) [Grupo tratado con metformina (MTF), Grupo tratado con Caldo de alaches Dosis Alta (CDA) y Grupo tratado con Caldo de alaches Dosis Baja (CDB)] más el grupo control (n=8) [grupo control (CNT)] que fue alimentado exclusivamente con dieta de mantenimiento, como se menciona arriba (dieta normal de mantenimiento para roedor Harlan-Teklad 2018S, administrada con

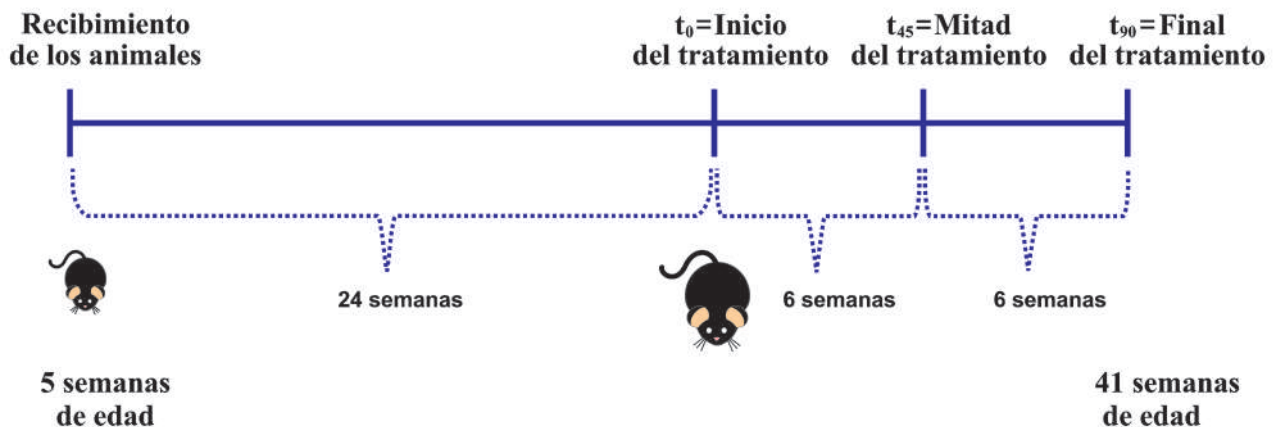


Figura 4. Diseño experimental. Créditos: Aurea Raquel González Macías

agua purificada, sin azúcar) y que estuvo en las mismas condiciones de alojamiento que los otros tres grupos. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes, con ciclos de 12 horas luz/oscuridad a 22°C y humedad relativa del cuarto experimental de 40-70%, con libre acceso al agua y comida. A los animales se les mantuvo en jaulas de polisulfonato con dimensiones de 18.41 cm x 29.21 cm x 12.7 cm con 4 individuos, cambiando posteriormente a dos individuos por jaula para minimizar los conflictos y tener un mejor manejo de las muestras, todo en conformidad a la norma NOM-062-ZOO-1999. La cama que se utilizó fue Pine Shavings Bedding de Envigo®.

En este experimento se plantearon tres puntos temporales importantes (Figura 4):

- 1) Antes de comenzar el tratamiento y momento que se considera como su inicio (t_0) con la administración del caldo de alaches (CDB y CDA) o metformina (MTF).
- 2) A los 45 días del tratamiento (t_{45}) para determinar el progreso de los animales con los tratamientos;
- 3) A los 90 días del tratamiento (t_{90}) cuando se considera el final del experimento. Debe recordarse que, para el t_0 , los animales de los grupos MTF, CDA y CDB ya habían estado recibiendo una dieta alta en grasa y tomando agua azucarada por 24 semanas.

Los grupos recibieron los tratamientos descritos en la Tabla 1 para comparar los posibles efectos del consumo de caldo con un tratamiento con metformina.

Los grupos que recibieron el caldo viscoso de alache fueron CDA y CDB, administrado de las alícuotas en refrigeración previamente descritas, utilizando un volumen de 60 μ L del caldo (1.8mg de sólidos del caldo de alaches/150mL de agua de bebida azucarada al 12%) para el grupo de dosis baja (CDB) y 600 μ L (18mg/150mL de agua de bebida azucarada) para el grupo de dosis alta (CDA), diluyendo los volúmenes señalados en 150 mL de agua azucarada, correspondientes al volumen de los bebederos de las jaulas. Se cambió cada dos días el líquido de bebida y se registró el volumen de líquido consumido; de esta forma se registraron las cantidades consumidas del caldo añadido a los bebederos.

Prueba oral de tolerancia a la glucosa. La prueba se realizó al principio (t_0) y al final del experimento (t_{90}); el día de la prueba se les retiró el alimento y el agua a los animales para garantizar seis horas de ayuno. Se les administró glucosa con una sonda oral (1g/kg de peso corporal (p.c.)) a los grupos aplicando el protocolo correspondiente de UNIPREC (PNOVA-UNAM-UNIPREC-01). La toma de muestras se apegó al protocolo normalizado para la toma de muestras de sangre de la UNIPREC (PNOMS-UNAM-UNIPREC-01). La muestra sanguínea fue tomada de la punta de la cola y se monitoreó el cambio en la concentración de glucosa en sangre con un glucómetro y tiras reactivas (Accu-Chek, Roche) a los tiempos 0, 15, 30, 45, 60 y 120 minutos posteriores a la administración. Se calculó el área bajo la curva con el método del trapecio, utilizando el software Graph Pad Prism 9.5.1. a partir de las gráficas creadas.

Tabla 1. Dosis administradas a los grupos experimentales.

GRUPO EXPERIMENTAL (N=8)	DOSIS	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DIETA
Control (CNT)	N/A	N/A	Alimento estándar (Teklad Global 2018S) / agua natural
Metformina (MTF)	50 mg/kg p.c.	Sonda oral	Alimento alto en grasa (Tso's High Fat Diet) / agua con azúcar al 12%
Mucílago dosis baja (MDB)	1X	En el agua de bebida	
Mucílago dosis alta (MDA)	10X		

MTF, MDA y MDB fueron administrados desde t_0 hasta t_{90} . N/A = nada administrado.

Análisis sanguíneo. El muestreo de sangre se hizo a todos los animales a los t_0 , t_{45} y t_{90} de acuerdo con los protocolos normalizados de la UNIPREC (PNOMS-UNAM-UNIPREC-01). El día de la prueba, se les retiró el alimento a los animales para garantizar seis horas de ayuno; los animales fueron anestesiados con isoflurano y la toma de muestra se hizo a través del plexo ocular, la muestra de sangre fue recolectada en Microtainers con heparina. Se hicieron “pools” de dos muestras de sangre para que el volumen recolectado garantizara suficiente volumen para realizar las pruebas bioquímicas y hemáticas.

Bioquímica sanguínea: Para la determinación de parámetros bioquímicos, las muestras de sangre, se tomaron en tubos con anticoagulante, se centrifugaron a 14,000 rpm/10 min en el equipo EPPENDORF. El plasma se separó en copas para muestra con ayuda una micropipeta TERMO Electron, se procesaron en el analizador de bioquímicas DIRUI código ABPA-UNIPREC-02. Se determinaron los niveles séricos de glucosa, colesterol, triglicéridos, nitrógeno ureico en sangre, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL); en el último muestreo (t_{90}) se midió además la hemoglobina glucosilada (HbA1c) con un kit comercial (Crystal Chem, IL).

Análisis macro y microscópico. Se realizó la necropsia de los animales de acuerdo con el procedimiento normalizado de operación para la realización de necropsias de la UNIPREC (PNone-UNAM-UNIPREC-01). Se recolectaron los siguientes órganos: bazo, hígado, riñón, glándula adrenal, corazón, tejido adiposo subcutáneo y mesentérico, páncreas, nodos linfáticos (uno relacionado con vía de administración y otro distante a ruta). Muestras de sus tejidos fueron fijadas en formol amortiguado al 10% e incluidas en casetes. Las muestras fueron deshidratadas y posteriormente incluidas en parafina, de las mismas se obtuvieron cortes de 3 micras de grosor. Los cortes fueron teñidos de manera convencional mediante la técnica hematoxilina y eosina. Las laminillas fueron analizadas por un patólogo certificado, en un microscopio LEICA DM500.

Análisis estadístico. Los datos son mostrados como la media de los experimentos \pm la desviación estándar de la media. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con múltiples comparaciones, utilizando la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples con $p < 0.05$ para considerar diferencia significativa. Las gráficas y el análisis fueron realizados utilizando el software Graph Pad Prism 9.5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caldo de alache. Se determinó la concentración de sólidos totales del caldo de alaches, en un promedio 30 mg/mL. Los sólidos totales para la muestra añadida al agua de bebida correspondieron a 1.8 mg de sólidos del caldo de alaches/150 mL de agua azucarada para la CDB y 18 mg de sólidos del caldo de alaches/150 mL de agua azucarada para la CDA. El agua estaba previamente azucarada en un 12%.

Análisis GC-MS preliminar del caldo de alaches. El caldo de alaches, como muchos de los platillos que se consumen en las localidades, está constituido por una mezcla compleja de fitoquímicos. En estudios previos de la Facultad de Química, realizados sobre hojas crudas por hidrodestilación del aceite esencial de *A. cristata*, se identificaron 70 metabolitos diferentes por GC-MS, siendo 26 compuestos los mayoritarios, reportados con efectos antiespasmódicos, inmunomoduladores, antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos y antibacterianos (Juarez-Reyes, 2016). Sin embargo, en el presente estudio se trabajó con el caldo de alaches de la preparación culinaria, y el análisis por GC-MS hecho es únicamente cualitativo y preliminar. El cromatograma se muestra en la Figura 5.

Entre los compuestos identificados cualitativamente por GC-MS se encuentran los siguientes: glicerol, azúcares: fructosa, glucosa, manitol, inositol, mio-inositol, sacarosa, trehalosa; ácidos: láctico, glicólico, d-2-aminobutírico, malónico, 4-aminobutanoico, glicérico, succínico, maléico, pipercolínico, málico, 4-aminobutanoico, 2,3,4 trihidroxibutírico, ribónico, azelaico, cítrico, glucónico,

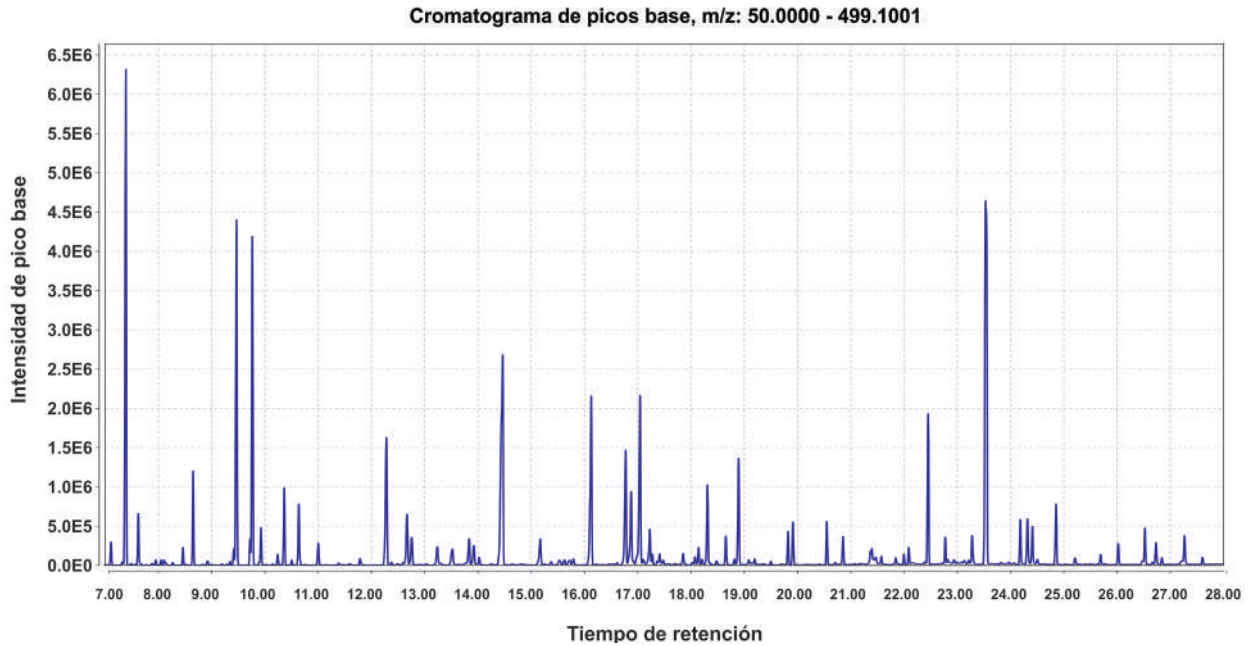


Figura 5. Espectro obtenido para el caldo de alaches por GC-MS. Realizado por Dr. Juan Carlos Páez, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

palmítico, místico, esteárico; aminoácidos: alanina, glicina, beta-alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, glicina, serina, treonina, ácido aspártico, homoserina, asparagina, ácido glutámico, fenilalanina, glutamina, lisina, tirosina, triptofano, y otros compuestos como: 3-piridinol, monoetanolamina, metacrililglicina, uridina, adenosina, guanosina, entre otros compuestos aun no identificados. En este cromatograma no se identificaron los flavonoides antes mencionados para alaches, por Juárez- Reyes en 2015, ya que se trata únicamente de un espectro cualitativo preliminar incluyendo solo los compuestos registrados en la base de datos del equipo. El objeto de este análisis es únicamente evidenciar la complejidad del caldo de alaches consumido tradicionalmente.

Modelo Animal. Al t_0 del experimento, los animales tenían en promedio 29 semanas de edad y al finalizarlo (t_{90}) 41 semanas. En la Figura 6 se muestran imágenes de un animal con alimentación estándar (CNT) versus uno de alimentación alta en grasa, con diferencias principalmente en su tamaño.

En la Figura 7 se presentan las gráficas de la ganancia de peso semanal de cada grupo: los grupos con una dieta alta en grasa mostraron una mayor tendencia hacia aumentar

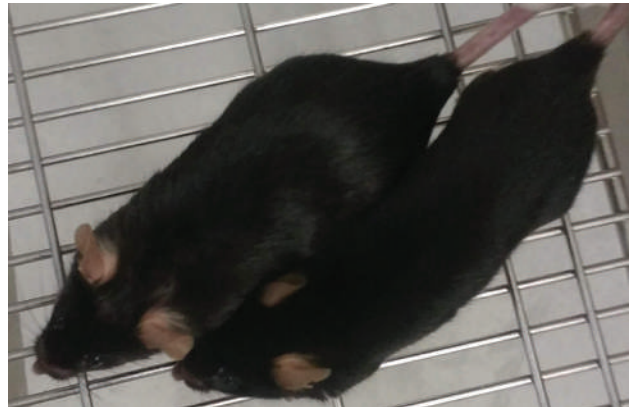


Figura 6. Animal con dieta alta en grasa (izq.), y con dieta estándar (der.). Foto: Aurea Raquel González Macías

de peso que el grupo CNT que consumió una dieta de mantenimiento de roedor con agua simple purificada. El peso promedio de los grupos experimentales fue de 26.57 g para el grupo CNT, 28.33 g para el grupo MTF, 28.17 g para el grupo con caldo de *A. cristata* dosis baja (CDB) y finalmente 29.28 g para el grupo CDA a lo largo del estudio (Fig 7A).

El grupo de CDA desde el comienzo mostró una tendencia a ganar más peso en comparación con los otros dos grupos, mostrando una diferencia significativa entre el grupo CNT y el CDA. El grupo CDA fue el que más

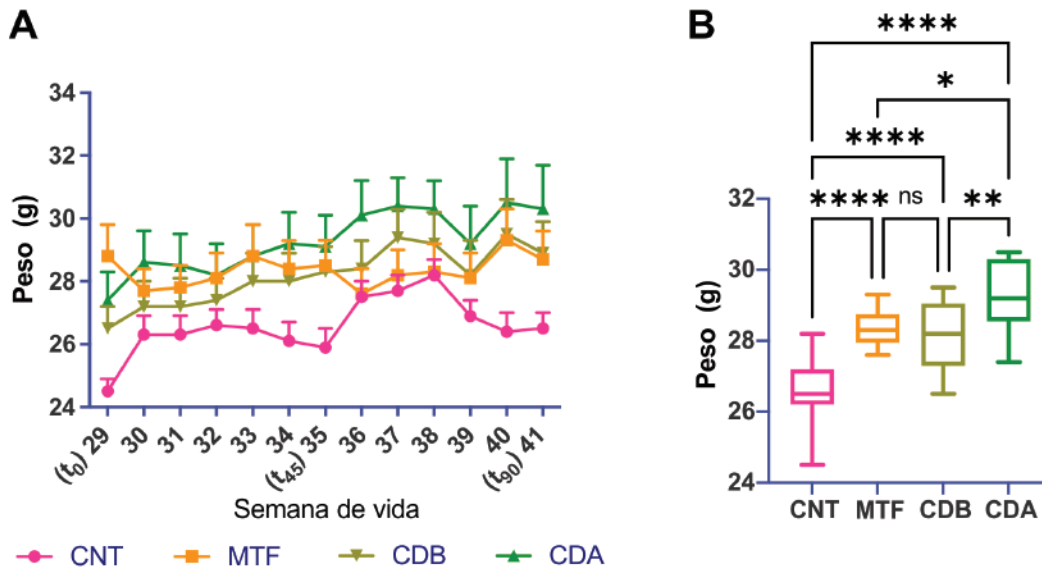


Figura 7. Variación del peso semanal (A) y por grupo experimental (B).

alimento consumió y el que más agua bebió; cabe señalar que el agua de bebida (azucarada) también aportaba calorías, estimándose un consumo extra de 60-68 kcal por semana, lo cual reitera que este grupo al consumir más agua mostrara una tendencia a ganar más peso, con una significancia de $p < 0.0021$; y comparado con el grupo CNT, esta diferencia es de $p < 0.0001$.

La dosis de caldo de alache que tomaron los grupos experimentales dependía directamente del agua que ingerían ya que el caldo se encontraba disuelto en la misma. Se llevó un registro diario del agua consumida, durante el experimento, el grupo CDB tomó una cantidad promedio de 130 ± 24 mg/kg p.c. de sólidos de caldo de alache y el grupo de CDA de 1338 ± 210 mg/kg p.c.

Respecto de la cepa de ratones utilizada, C57BL/6NHsd, se ha descrito previamente que esta cepa alimentada con diferentes dietas comerciales es un buen modelo para el estudio de la intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Montes García, 2017). Durante el desarrollo de este experimento los animales presentaron conducta agresiva, alopecia y algunas lesiones. Esta cepa presenta una mutación en el gen Lep (leptin) que codifica para la hormona responsable del control de peso; la presencia de este gen mutado produce una marcada obesidad asociada

con hiperfagia e hiperinsulinemia (Benavides & Guenet, 2000) por lo que, los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con la bibliografía. Sin embargo, tomando en cuenta las conductas agresivas de los animales durante el desarrollo de este experimento, los resultados indican que, para experimentos con un largo periodo de duración, como éste, el modelo no resultó idóneo.

Prueba oral de tolerancia a la glucosa. La prueba consiste en el monitoreo de la glucemia, en un individuo en ayuno, después de recibir una carga de glucosa (1g por kg de p. c.), para diagnosticar diabetes a individuos que hayan presentado glucosa alterada en ayuno o que tengan factores de riesgo para desarrollar diabetes tipo 2 (Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2008). La Figura 8A muestra los resultados de esta prueba al t₀ del experimento es decir antes de comenzar el tratamiento con MTF, CDB o CDA y después de consumir una dieta alta en grasa y agua azucarada por 24 semanas. Todos los grupos presentaron un comportamiento similar, al mostrar un incremento en promedio casi del doble de concentración de glucosa en sangre al ser administrados con la carga de glucosa y presentaron una disminución paulatina hasta los 120 minutos, alcanzando todos un valor basal (superior en este experimento para los grupos CDA y de CDB).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (Reinauer *et al.*, 2005) la diabetes se define como un valor de glucosa plasmática en ayuno ≥ 7.0 mmol/L (126 mg/dl), para el modelo de obesidad en ratones el valor de glucosa plasmática en ayuno es de ≥ 7.1 mmol/L (126.3 mg/dl). El grupo CNT mostró valores normales en ayuno y después de dos horas de la prueba: 6.8 ± 0.14 mmol/L (122.51 ± 10.42 mg/dL) y 7.0 mmol/L ± 0.89 (126.11 ± 16 mg/dL) respectivamente. Los valores mostrados por los grupos experimentales alimentados con dieta alta en grasa y agua azucarada mostraron valores de glucemia en ayuno en promedio de 7.01 ± 1.47 mmol/L (126.3 ± 26.48 mg/dL) y después de las dos horas un valor promedio de 9.1 ± 1.52 mmol/L (163 ± 27.38 mg/dL) lo cual se considera como intolerancia a la glucosa, y se observa en el panel B de la Figura 8.

No se encontró una diferencia significativa en la concentración de glucosa en sangre entre los grupos experimentales (MTF, CDB y CDA) al t_0 del experimento sin considerar el grupo control, ya que se esperaba observar, como sucedió, en esta etapa un comportamiento diferente entre el grupo control y los grupos alimentados con la dieta alta en grasa, poniendo en evidencia la respuesta distinta a las dietas respecto de la gluconeogénesis del hígado en ayunas, la respuesta de glucosa en sangre y su asimilación en el tejido muscular e hígado.

En la Figura 9 se observan los valores al t_{90} , indicando un comportamiento diferente del de la Figura 8. Los animales mostraron un incremento en los primeros minutos de la prueba, y esta va disminuyendo gradualmente conforme transcurre el tiempo lo que indica que el metabolismo de la glucosa se está llevando a cabo de una forma adecuada (Fig. 8A). Se observó también una tendencia a regresar al valor de glucosa inicial en un menor tiempo. El grupo control se comporta como un grupo saludable, que ante la carga de glucosa regresa a sus valores basales al cabo de dos horas posteriores al inicio de la prueba.

Los valores de glucosa en sangre en ayuno de los grupos CNT y MTF al t_{90} se consideran normales con 6.06 ± 1.05 mmol/L (108.85 mg/dL ± 18.82) y 5.78 ± 1.4 mmol/L (103.88 ± 25.12 mg/dL) respectivamente (Figura 9A), mientras que los grupos con CDB y CDA, que ya mostraban una tendencia hacia la intolerancia a la glucosa desde el t_0 , (Fig. 8) mostraron valores de 8.3 ± 1.6 mmol/L (149.5 mg/dL ± 28.89 mg/dL) para el grupo de CDB y 7.88 ± 1.08 mmol/L (142 ± 19.51 mg/dL) para el grupo CDA. Después de dos horas todos los grupos regresaron a valores iniciales normales (Figura 9A) e incluso alcanzaron valores menores. Esto indica que el consumo del caldo de *Anoda cristata* permite obtener valores de glucosa en sangre similares a los valores mostrados por el grupo tratado con metformina (Fig. 9B), probablemente debido al

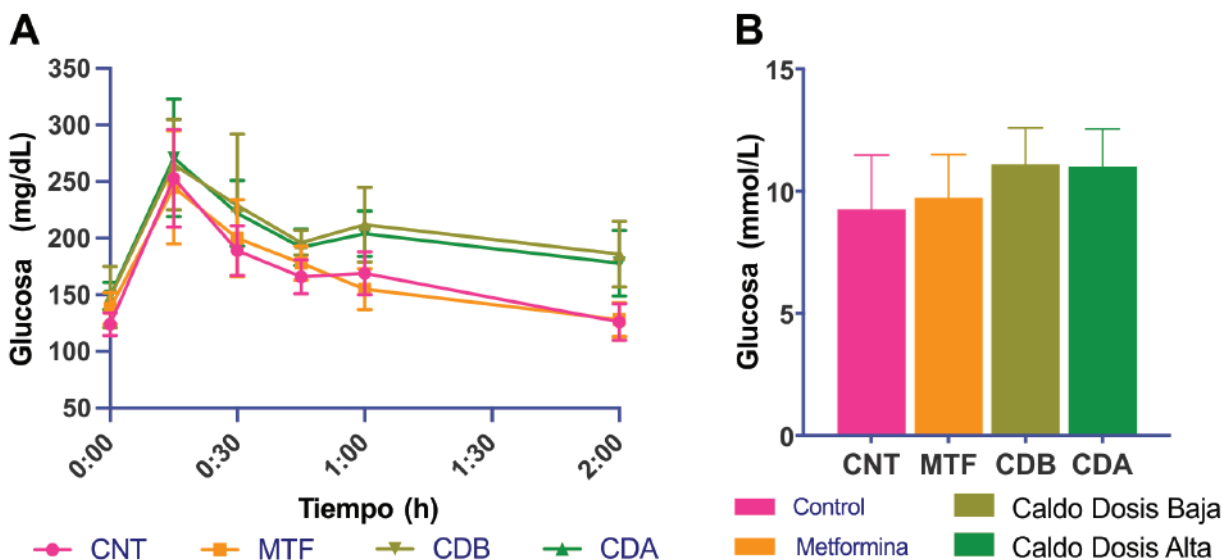


Figura 8. Prueba inicial (t_0) de tolerancia a la glucosa y valores de glucosa en sangre por grupo.

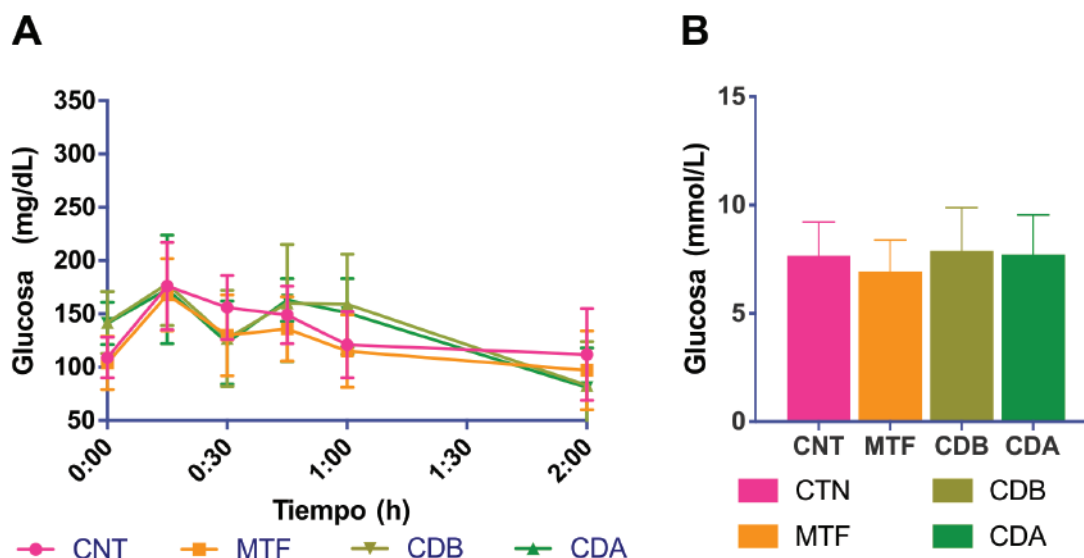


Figura 9. Prueba final (t_{90}) de tolerancia a la glucosa y valores de glucosa en sangre al t_{90} .

contenido de flavonoides, polisacárido y fitocompuestos de la preparación culinaria estudiada.

El cálculo del área bajo la curva para la prueba de tolerancia a la glucosa se muestra en la Figura 10 a los tiempos 0 y 90 días (t_0 y t_{90}) de la administración del caldo de alaches o la metformina. En esta figura (Fig. 10) se muestra un comportamiento similar de todos los grupos CNT, MTF, CDB y CDA, lo que indicaría que el caldo de alaches permite mantener los niveles de glucosa a niveles similares a los obtenidos con metformina, y de igual manera con CDA y más bajos aun con CDB, como lo reporta Juárez *et al.* (2015).

Todos los grupos muestran el mismo comportamiento, no encontrando diferencias entre los valores iniciales y los finales, salvo para el grupo CDB que mostró un valor menor de área bajo la curva de tolerancia a la glucosa. Lo anterior coincide con lo reportado por Juárez *et al.* (2015), pues ellos encuentran también que la dosis menor del extracto acuoso de la planta permite obtener mejores resultados respecto de la disminución de glucosa en sangre, como sucedió en el presente estudio después del consumo del caldo de *Anoda cristata* preparado de la forma tradicional. En el presente estudio los animales consumieron la totalidad del caldo de una preparación culinaria. Los efectos

mostrados en las figuras anteriores pueden explicarse porque resultan de una mezcla de las observaciones de Juárez *et al.* (2015), incluyendo lo que ellos describen, como es una inhibición del transporte de glucosa debido a los componentes hipoglucemiantes o su atrapamiento en la textura viscosa del caldo.

Bioquímica sanguínea. Se evaluaron los parámetros bioquímicos en plasma, dando prioridad a aquellos que indican un posible daño renal o alteraciones en el metabolismo de los animales: glucosa, colesterol total, triglicéridos, nitrógeno ureico en sangre, HDL, LDL y hemoglobina glicosilada (HbA1c). En la Figura 11 se muestra el parámetro de glucosa en plasma que se determinó a los t_0 , t_{45} y t_{90} del experimento (posterior a la alimentación de 24 semanas con dieta alta en grasa y agua de bebida azucarada), obteniendo un valor de concentración de glucosa mayor con respecto a la técnica de tiras reactivas utilizada en la prueba de tolerancia a la glucosa. De acuerdo con los valores obtenidos los animales mostraron un trastorno de la tolerancia a la glucosa, ya que en ayuno mostraron valores mayores a 7 mmol/L (126 mg/dL) (Asociación Latinoamericana de Diabetes, 2006).

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con dieta alta en grasa y azúcar

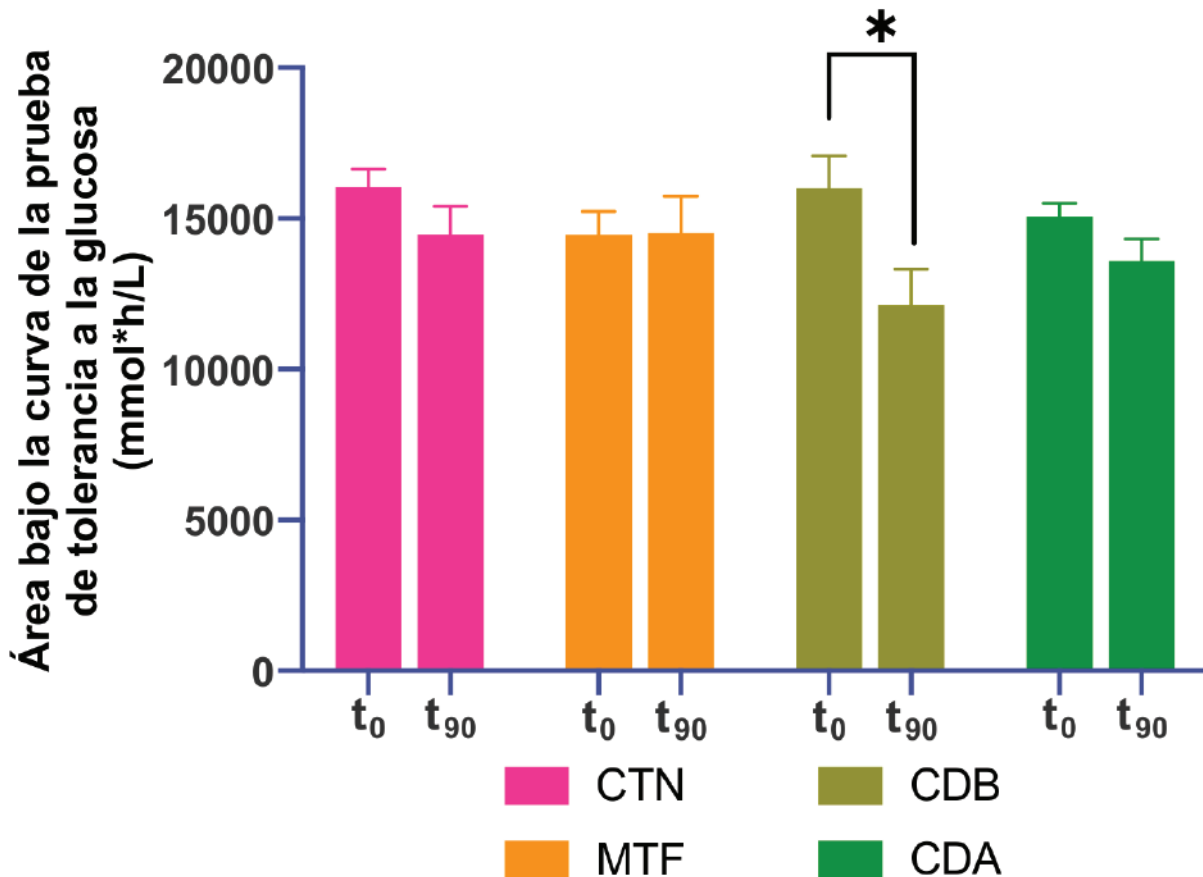


Figura 10. Área bajo la curva de las pruebas de tolerancia a la glucosa: inicial (t₀) y final (t₉₀).
* Con diferencia significativa

en ninguno de los tres tiempos, lo que implica que los grupos CDA y CDB mostraron un comportamiento similar al grupo MTF y al grupo CNT que no tuvo ningún tratamiento. Esto indica que los grupos CDB y CDA, así como el grupo MTF permiten mantener valores de glucosa en sangre similar a los animales que no han consumido una dieta alta en grasa, acompañada de agua azucarada.

En la figura 11 no se presenta una diferencia significativa entre los grupos de estudio, a pesar de verse una ligera tendencia a elevarse la concentración de glucosa en sangre, debido a la dispersión de los resultados. Es importante destacar que en el grupo CDB el valor de glucosa en sangre no incrementó después de los 45 días, mientras que el resto de los tratamientos mostraron una tendencia a incrementar con el tiempo, dicho comportamiento está asociado con el consumo de la muestra de alache a dosis bajas y coinciden los

resultados con respecto al área bajo la curva para la prueba de tolerancia a la glucosa.

En algunos modelos murinos, los niveles de glucosa y resistencia a la insulina se incrementan con la edad de los animales (King, 2012). La naturaleza heterogénea de la diabetes tipo 2 y el hecho de que se prevé que su prevalencia incremente en el mundo en las próximas décadas, hace que cualquier información proveniente de modelos animales sea de ayuda. Aunque no se alcanzaron plenas condiciones de diabetes en los animales, se puso de manifiesto el efecto de una dieta alta en grasas y el consumo de agua azucarada en los parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos. A su vez, se mostró el efecto del consumo del caldo de alaches que resultó ser similar a la administración de un medicamento alopático (metformina). Los niveles de colesterol y TG en sangre se muestran en la figura 12A y 12B, respectivamente.

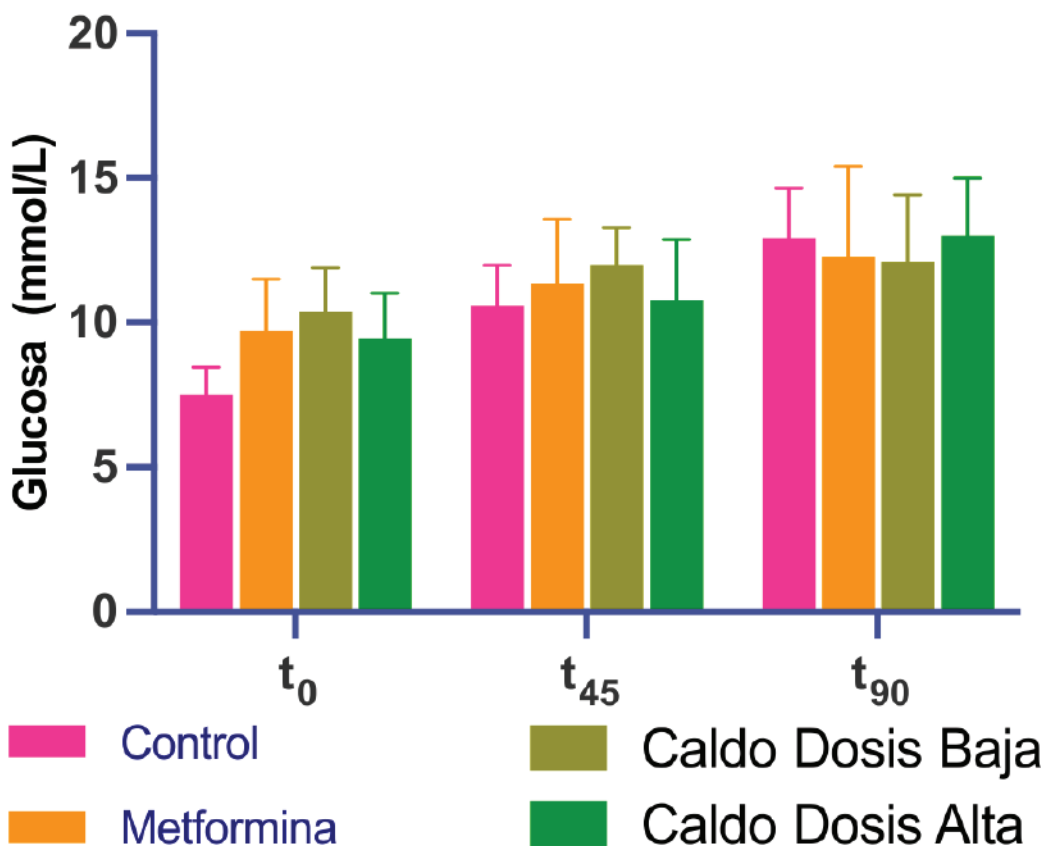


Figura 11. Concentración de glucosa en plasma a los tiempos 0, 45 y 90 min posterior a la administración.

Para el caso del colesterol en sangre puede observarse que los grupos alimentados con una dieta alta en grasa y azúcar (MTF, CDB y CDA) mostraron un incremento significativo con respecto al tiempo del tratamiento (Figura 12A). Bruell *et al.* (1962), reportaron para este tipo de cepa alimentada con una dieta control, un valor promedio de colesterol de 111 ± 29 mg/100 mL (2.87 ± 0.75 mmol/L), lo cual coincide con lo obtenido en el presente experimento. Bruell *et al.* (1962), proponen también que el factor con más influencia es el sexo de los animales sobre la edad; en otras palabras, habrá mayor diferencia en los niveles de colesterol de los ratones macho comparados con los de las hembras y en cada sexo será mayor el valor para los especímenes adultos comparados con los jóvenes. Aunque en este experimento no se utilizaron elementos machos, el comportamiento coincide con lo reportado en la literatura para esta cepa respecto de la edad de los animales.

En ratones obesos se han reportado valores de colesterol en sangre de 160 – 200 mg/100mL (4.1 – 5.1 mmol/L) (Bruell *et al.*, 1962). Sin embargo no se especifica el sexo de los ratones, por lo que, de manera general, se pueden considerar los resultados obtenidos en estos experimentos como en el límite alto para este parámetro bioquímico, encontrando un aumento estadísticamente diferente entre los grupos alimentados con dieta alta en grasa y agua azucarada con el grupo control, a los tiempos 45 y 90 del tratamiento. Cabe hacer mención que la dieta alta en grasa no se suspendió en ningún momento, por lo que no se observa una disminución en los niveles a pesar del uso del caldo de alaches. Es bien sabido, que para que un individuo tenga una baja en los niveles de colesterol en sangre es necesario disminuir la ingesta de alimentos altos en grasa, así también se sugiere realizar actividad física diaria que aumente el metabolismo del individuo. El nivel de colesterol en sangre está ligado a la cantidad de colesterol transportado por las lipoproteínas.

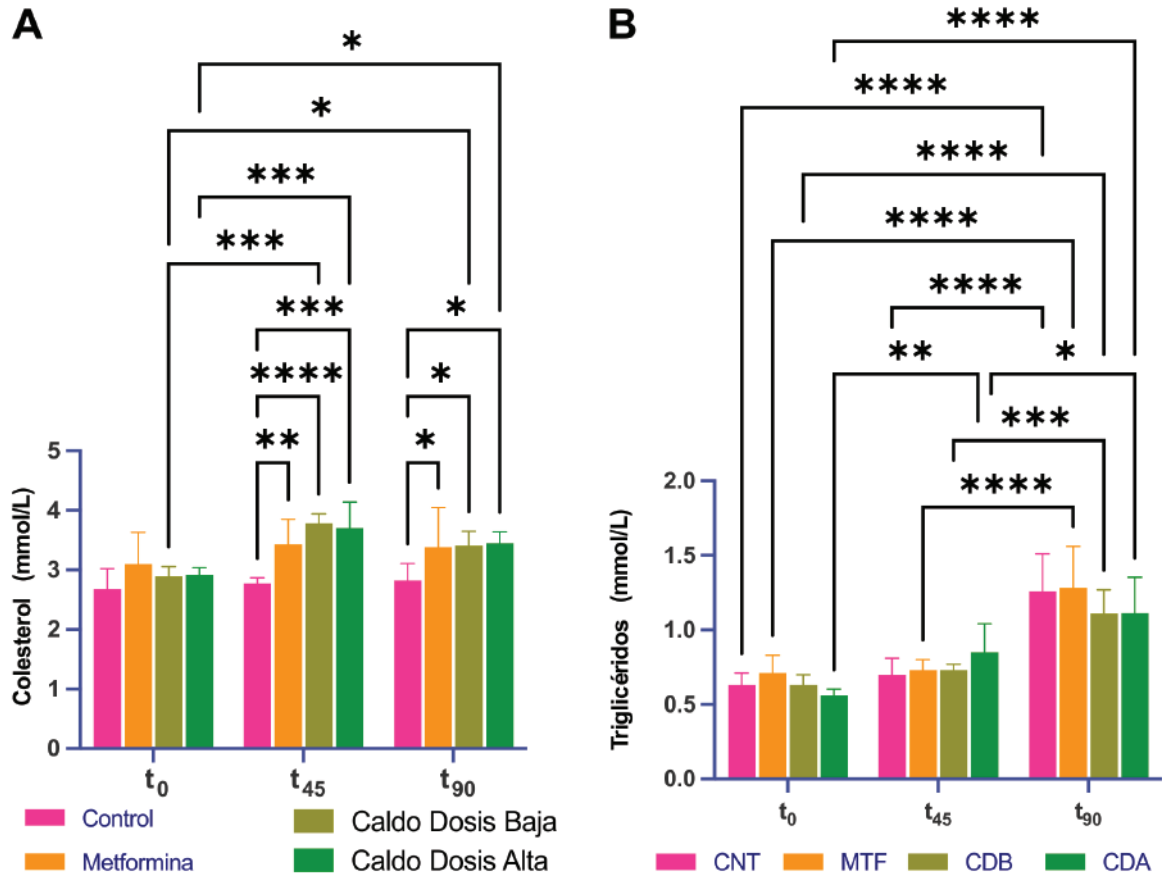


Figura 12. Valores de colesterol (A) y valores de triglicéridos (B) en sangre.

Los valores de TG de los animales que consumieron caldo de alaches diariamente (CDB y CDA) (Figura 12B), mostraron diferencias significativas con respecto al tiempo de muestreo, siendo los niveles al tiempo 90, mayores para todos los grupos. Sin embargo, el consumo de caldo de alaches permite obtener valores similares al grupo control en los tres tiempos del tratamiento, lo que indica que su consumo ayuda a controlar este parámetro en los animales alimentados con una dieta alta en grasa y con el agua de bebida azucarada, y también se comportan en forma similar al grupo tratado con metformina. Al t₉₀ los grupos que consumieron caldo de alaches (CDA y CDB) mostraron una tendencia a tener valores de TG menores, pero no hay una diferencia significativa debido a la dispersión de los resultados.

Los TG procedentes tanto de la alimentación y de su propia síntesis en el hígado, son la principal fuente de energía del organismo en los períodos entre las comidas, los TG

van desde el hígado a los distintos tejidos para cubrir sus necesidades metabólicas y los que no son utilizados, se depositan en el tejido adiposo (Cachofeiro, 2009). Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento semejante para todos los grupos, sugiriendo que no hubo diferencias en la concentración de TG respecto a la dieta administrada, sino probablemente debido a la edad de los animales.

De acuerdo con Eisinger *et al.* (2014), el colesterol en ratones alimentados con una dieta alta en grasa tiende a ser elevado mientras que los TG en suero no se muestran tan incrementados comparados con el control. Lo anterior no coincide con lo observado en este experimento. Al t₉₀, tanto colesterol como TG se muestran incrementados con respecto al t₀, relacionado este cambio con la edad de los animales y no con el tratamiento. Puede concluirse que no hubo hiperlipemia en los animales durante el experimento, considerando un límite alto al final

del experimento más bien relacionado con la edad de los animales y no con la dieta o los tratamientos administrados. La comparación entre tratamientos mostró algunas diferencias estadísticamente significativas al interior de los tres tiempos de muestreo: t_0 , t_{45} y t_{90} , y sí mostró aumentos significativos entre esos tres tiempos de muestreo.

Nitrógeno ureico en sangre. El nitrógeno ureico en sangre (BUN por sus siglas en inglés) es el producto del procesamiento de la proteína en el hígado, excretada como urea en orina. La existencia de valores elevados de nitrógeno ureico en sangre indicaría alguna falla en la función renal, por lo que debe contrastarse con los valores de creatinina y urea, no mostrados aquí. En este estudio no se presentaron fallas renales en los animales. Todos los tratamientos tuvieron una diferencia significativa comparados con el control en cada corte de tiempo, lo que sugiere que la diferencia encontrada se debe principalmente a las diferencias en la dieta, es decir, aquellos grupos con una dieta rica en grasas y agua azucarada, suplementada con caldo con mucílago de alaches mostraron una menor concentración de nitrógeno ureico en sangre, al igual que el grupo MTF con una dieta alta en grasa y agua azucarada, señalando diferencias

significativas entre el grupo CNT y los grupos MTF, CDB y CDA (Figura 13A). El valor de BUN del grupo CNT aumentó ligeramente durante el tiempo del experimento, sin embargo siempre se mantuvo en valores normales para la cepa murina utilizada. Los valores normales de BUN para animales de la cepa C57BL/6 es de 7.14 a 14.28 mmol/L (20 a 40 mg/dL). Se encontraron diferencias significativas entre los valores mostrados por cada grupo experimental, en los tres cortes de tiempo, y aumentaron muy ligeramente a lo largo del tratamiento, pero siempre dentro de los intervalos normales para BUN en la cepa utilizada, evidenciando probablemente el efecto de la edad de los animales.

La glucosa de la sangre se une a la hemoglobina que transporta el oxígeno desde los pulmones a todas las células del organismo para formar la HbA1c. El porcentaje de hemoglobina glicada o glicosilada considerado como normal es menor a 5.7%, como se observa en la figura 13 para todos los grupos de estudio. Esta proteína permanece en la sangre durante 120 días, por lo que sus niveles representan un promedio del nivel de glucosa en los últimos dos o tres meses, a diferencia del simple análisis de glucosa en la sangre, que sólo indica su estado en un momento determinado. La HbA1c ha resultado ser un buen marcador

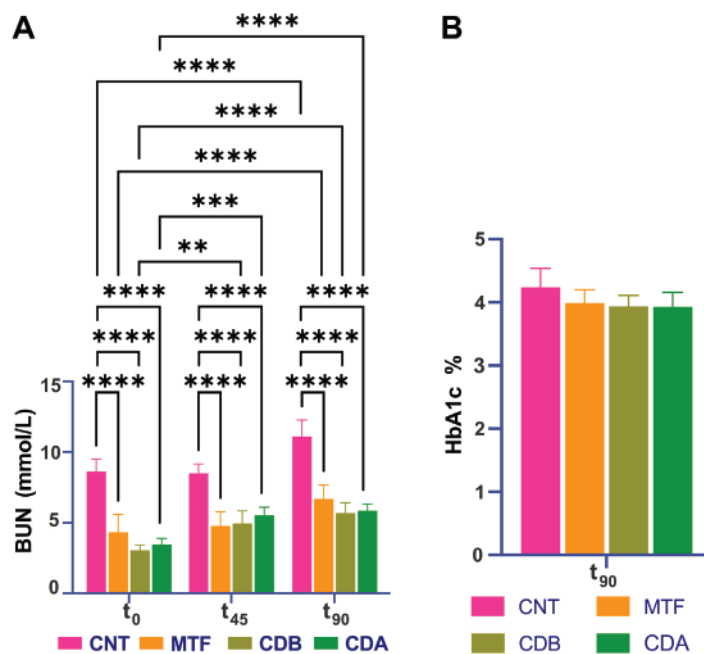


Figura 13. Nitrógeno uréico en sangre BUN por sus siglas en inglés (A) y hemoglobina glicosilada (HbA1c) (B).

para evaluar si existe un factor de riesgo cardiovascular y ayuda a diferenciar la hiperglucemia de otros eventos agudos como el estrés o un evento coronario (Jiménez Mateos-Cáceres, 2009). Se puede observar en la Figura 13B que, a pesar de no haber una diferencia significativa entre los grupos de estudio, hay una tendencia relacionada con el consumo de algún coadyuvante, presente en el caldo con mucílago de alaches, para mejorar la asimilación de la glucosa y comportarse como el grupo MTF. No se observó una diferencia significativa entre los grupos estudiados, por lo que sería posible concluir que tanto el grupo tratado con metformina y los tratados con CDB y CDA se comportan de manera similar al grupo CNT que no consumió dieta alta en grasa y agua azucarada, indicando un efecto del consumo de caldo de alaches que se equipara al consumo de metformina respecto de los niveles hallados de hemoglobina glicada.

El nivel de colesterol en sangre está ligado a la cantidad de colesterol transportado por las lipoproteínas. Las HDL transportan el colesterol al tiempo que eliminan de la circulación sanguínea su contenido excedente y evitan que ocasione problemas al organismo. Por lo tanto, los niveles de HDL se correlacionan inversamente con el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (Jiménez

Mateos-Cáceres, 2009). En el caso de las HDL hay diferencia estadísticamente significativa del grupo CDB comparado con el grupo CNT al t_{45} (Figura 14) cuando se vieron aumentadas. Si se considera el efecto promedio de los tres tiempos por tratamiento y se hace la comparación estadística, resulta que hay diferencia significativa entre el grupo CDB y CDA comparadas con el grupo CNT. Por el contrario, no hubo diferencia significativa entre el grupo MTF y el grupo CNT. En resumen, puede observarse un efecto promedio directo del consumo de caldo de alaches sobre este parámetro, sugiriendo que su consumo eleva ($p < 0.05$) los valores de HDL.

Para el caso de las LDL, en cada corte de tiempo, todos los tratamientos (CDA, CDB y MTF) resultaron ser significativamente mayores respecto del grupo CNT, por lo tanto es posible pensar que se trata de un cambio relacionado con la dieta alta en grasa y agua azucarada, no con el tratamiento ya sea con metformina (MTF) o con las dosis ensayadas de caldo de alache (CDB y CDA). Las alteraciones del metabolismo de los lípidos se han establecido como factores de riesgo cardiovascular desde hace décadas. El colesterol es un componente fundamental para mantener la estructura de las células que forman los tejidos de nuestro organismo.

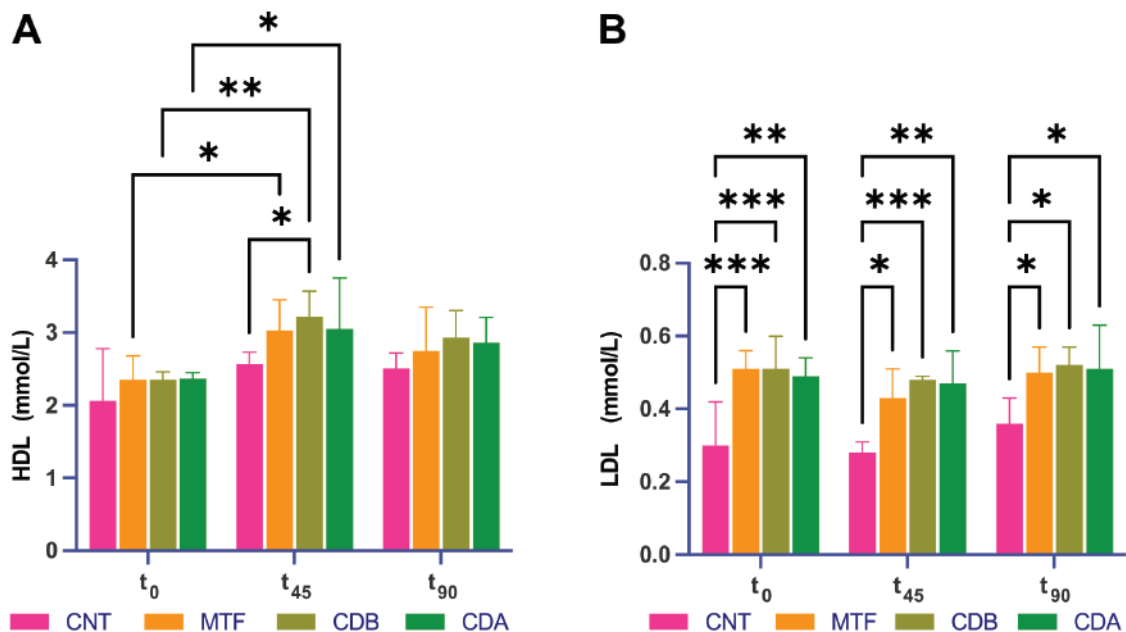


Figura 14. Lipoproteínas de alta densidad (HDL) (A) y de baja densidad (LDL) (B).
* Con diferencia significativa respecto del control.

Las LDL son partículas que transportan el colesterol por la sangre; si existe lesión vascular, tienden a acumularse en la pared de los vasos causando graves daños que originan el comienzo de problemas vasculares. Además, las LDL pueden oxidarse y tienen un efecto aún más deletéreo sobre los vasos sanguíneos, por lo que son consideradas un factor potencial en el proceso de daño vascular (Jiménez Mateos-Cáceres, 2009). La dieta alta en grasa elevó los niveles de colesterol, HDL y LDL respecto del grupo CNT, pero los grupos tratados con el caldo de alaches mostraron tener efectos similares a los de la metformina; el aumento en LDL no logró ser contrarrestado por el caldo de alaches o la metformina, pero aun así las HDL sí lograron elevarse al menos al t_{45} , (no aumentan más en el t_{90}) cuando resultaron significativamente mayores que los valores del grupo CNT, sobre todo en el grupo CDB (Figura 14A).

Biometría hemática. En el análisis de la llamada “serie roja” se observó que no hay alteraciones en los grupos experimentales comparadas con el grupo CNT, durante todo el experimento, no existiendo diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

Descripción macroscópica de los órganos. En los animales del grupo CNT no se observaron lesiones macroscópicas en ninguno de los órganos estudiados. Mientras que, en los animales con dieta alta en grasa, es decir, el grupo que recibió metformina y los grupos con ambas dosis de caldo, la única observación macroscópica observable se encontró a nivel de hígado con un aumento de tamaño, aspecto suave y amarillo. El resto de los órganos estudiados no presentaron lesiones macroscópicas. Los resultados obtenidos en

este experimento muestran que los animales con dieta alta en grasa y agua de bebida azucarada desarrollaron esteatosis macrovascular en el hígado comparados con el grupo CNT con dieta estándar de mantenimiento para roedores (Figura 15A). Los grupos MTF, CDB y CDA desarrollaron hígado graso y aparentemente el caldo de alache no aminoró el desarrollo de esta condición, de acuerdo con los resultados observados en la morfología (Figura 15B).

En la Tabla 2 se muestra el resumen de resultados de las observaciones histopatológicas:

Descripción microscópica. De manera aleatoria en los grupos con dieta alta en grasa se observó que entre 10-70% de los hepatocitos, contienen en su citoplasma múltiples vacuolas (Figura 15). Estas lesiones están relacionadas con la esteatosis hepática de leve a grave.

CONCLUSIONES

Los grupos experimentales de MTF, CDB y CDA recibieron una dieta alta en grasas y agua azucarada durante 36 semanas de duración del experimento. Durante este tiempo los animales generaron sobrepeso, mostraron intolerancia a la glucosa y esteatosis hepática. En la prueba de tolerancia oral a la glucosa, los animales que consumieron el caldo de alache junto con la dieta alta en grasa y agua azucarada de bebida, mostraron niveles de glucosa similares a los del grupo tratado con metformina. A pesar de la intolerancia a la glucosa mostrada por los grupos alimentados con dieta alta en grasa y bebida azucarada, sus parámetros se mantuvieron en intervalos similares al grupo control y al grupo tratado

Tabla 2. Cambios histológicos

GRUPO	BAZ	HÍG	RIÑ	G.AD	COR	TAS	TAD	PÁN	NLA	NLD
CNT	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP
MTF	SCHP	EST+	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP
MDB	SCHP	EST++	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP
MDA	SCHP	EST+	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP	SCHP

CNT=Control, MTF=Metformina, MDB=Mucilago dosis baja, MDA=Mucilago dosis alta, Baz = Bazo, Híg = Hígado, Riñ = Riñón, G.Ad = Glándula adrenal, Cor = Corazón, TAS = Tejido adiposo subcutáneo, TAD=Tejido adiposo mesentérico, Pán =Páncreas, NLA = Nodos linfáticos relacionados a la vía de administración, NLD=Nodos linfáticos distales relacionados a la vía de administración. SCHP= Sin cambio histopatológico, EST= Esteatosis, + = leve, ++ = moderada, +++ = grave.

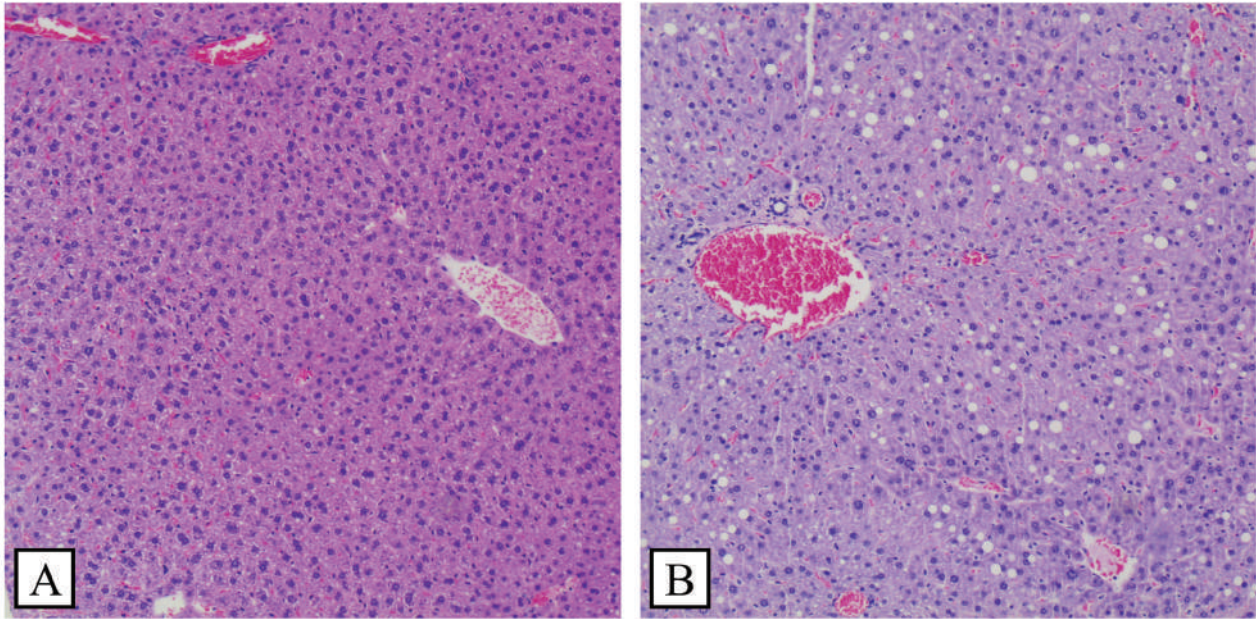


Figura 15. Corte histológico de hígado 5X (A); 10X (B).

con metformina tuvieron cambios menos exacerbados y no pasaron por los picos de glucosa observados en el grupo CNT o el grupo MTF. Lo anterior indica un efecto del caldo de alaches sobre los niveles de glucosa sanguínea, al consumirlo diariamente. Además, es importante destacar que el grupo CDB, mantuvo valores cercanos a los valores normales, por lo que se puede pensar que tiene un efecto estabilizante sobre la concentración de glucosa, a pesar del consumo de una dieta alta en grasa y agua de bebida azucarada.

El consumo diario del caldo en dosis baja permitió controlar en los animales del estudio todos los parámetros bioquímicos y mantenerlos en niveles similares a los de un tratamiento con metformina o bien similares a los valores del grupo CNT que no consumían la dieta alta en grasa o agua azucarada.

La composición del caldo de alaches es sumamente compleja puesto que no sólo contiene el mucílago, que probablemente ayude a aminorar la velocidad de absorción de la glucosa, sino también contiene flavonoides antihiperoglucemiantes, y algunos otros fitoquímicos que contribuyen, en conjunto, al efecto observado.

A pesar de la esteatosis observada en los animales alimentados con la dieta alta en grasa, agua azucarada y caldo de alaches en la bebida, sus parámetros bioquímicos resultaron similares a los de los animales tratados con metformina, lo que comprueba la efectividad de este alimento para mejorar la bioquímica de los animales que mostraron intolerancia a la glucosa. También se demostró que el consumo de caldo de alache en su dosis baja eleva los niveles de HDL, o el conocido como colesterol bueno.

En este trabajo se logró comprobar que el caldo de alaches, obtenido de una preparación culinaria tradicional, fue capaz de estabilizar los niveles de los distintos parámetros bioquímicos, a pesar de que los animales consumieran una dieta alta en grasa y bebieran agua azucarada, lo que revaloriza al consumo tradicional de este quelite. A lo largo del estudio se evidenció que el grupo CDB generalmente no muestra diferencias significativas con el grupo MTF, por lo que podría decirse que se comporta de manera similar al tratamiento con metformina.

Los resultados de este estudio permiten proponer que *Anoda cristata* sea incluida en diversos alimentos, además

de que se estudien formas de extraer su mucílago, aun de hojas secas, para generar fórmulas que apoyen a pacientes con intolerancia a la glucosa, causada por una alimentación deficiente, como sucede en la población mexicana.

AGRADECIMIENTOS

Al patólogo certificado de UNIPREC: Raúl Reséndiz Pozos. A los Dres. Juan Carlos Páez e Israel García del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por su apoyo en el análisis de GC-MS; y al personal de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC), Facultad de Química, UNAM, entre ellos a A. Mösso-Vázquez, M. Hernández, L. Romero, N. Aguilar y L. Macías, por su apoyo en el manejo de los animales. A Oscar Hernández Breña y al proyecto CONACYT 214286 por su apoyo para este estudio.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, F., S. Sairam and A. Urooj. 2011. *In vitro* hypoglycemic effects of selected dietary fiber sources. *J Food Sci Technol* 48(3): 285–289 DOI 10.1007/s13197-010-0153-7
- Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2006. Definición y diagnóstico de la diabetes mellitus y otros problemas metabólicos asociados a regulación alterada de la glucosa. En: Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (Vol. XIV (3): 107-110).
- Benavides, F., & J. L. Guenet. 2000. Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina* 61, 215-231. Obtenido de http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol61-01/2/v61_n2_p215_231.pdf
- Bruell, J. H., A. F. Daroczy, H. K. Hellerstein, 1962. Strain and Sex Differences in Serum Cholesterol Levels of Mice. *Science* 135(3508): 1071-1072. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.135.3508.1071>
- Cachofeiro, V. 2009. Alteraciones del colesterol y enfermedad cardiovascular. En: M. M. Lopez Farré A. *Libro de la Salud Cardiovascular*: 131-139. Fundación BBVA. Bilbao, España.
- Campos-Vega Rocio, B. D. Oomah. 2013. Chemistry and classification of phytochemicals. In: Tiwari, B. K., N. P. Brunton, C. S. Brennan (Eds.) *Handbook of Plant Food Phytochemicals. Sources, stability and extraction*. Wiley-Blackwell, USA.
- Castro Lara, D., F. Basurto Peña, L. M. Mera Ovando and R. A. Bye Boettler. 2011. *Los quelites, tradición milenaria en México* Estado de México. Universidad Autónoma Chapingo.
- Dávila-Torres, J., J. González-Izquierdo, A. Barrera-Cruz. 2015. Panorama de la obesidad en México. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social* 53(2): 240–249.
- Devi, V. D. and A. Urooj. 2015. Possible hypoglycemic attributes of *Morus indica* L. and *Costus speciosus*: An in vitro study. *Mal. J. Nutr* 21(1): 83-91.
- Doostdar, H., M.D. Burke and R.T. Mayer. Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. 2000. *Toxicology* 144 (1-3): 31-38. DOI: 10.1016/S0300-483X(99)00215-2
- Eisinger, K., G. Liebisch, C. Schmitz, S. Aslanidis, C. Krautbauer, C. Buechler. 2014. Lipidomic analysis of serum from high fat diet induced obese mice. *International Journal of Molecular Sciences* 2991-3002
- FPP-UNAM-UNIPREC-01. Formato de Protocolo Preclínico. UNIPREC Documento interno.
- Gasparetto, J. C., C. A. Ferreira Martins, S.S. Hayashi, M. F. Otuky, R. Pontarolo. 2011. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64: 172-185.
- INEGI 2022. *Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes*. Disponible en: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwik18bz2KKBAxVggf0HHRbQAWgQFnoECAOQAw&url=https%3A%2F%2Fwww.inegi.org.mx%2Fcontenidos%2Fsaladeprensa%2Faproposito%2F2022%2FEAP_DIABETES2022.docx&usq=AOvVaw10J-rT5TPnA6kT9BRqsiYc&opi=89978449
- Jiménez Mateos-Cáceres, P. 2009. Marcadores sanguíneos utilizados en el diagnóstico y pronóstico del riesgo cardiovascular. En: A. López Farré, y C. Macaya Miguel. Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA: 231-238. Bilbao, España.

- Juárez-Reyes, K., F. Brindis, O. N. Medina-Campos, J. Pedraza-Chaverri, R. Bye, E. Linares, and R. Mata. 2015. Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology* 161: 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.052>.
- Juárez-Reyes, K. 2016. Estudio de la especie *Anoda cristata* (L.) Schlttdl. (Malvaceae) como fuente potencial de agentes útiles para el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM, México.
- King, A. J. 2012. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology* 166(3): 887–894. doi:<http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
- Linares, E., y R. Bye. 2015. Importancia de las especies vegetales de uso tradicional subvaloradas y subutilizadas de las milpas de México. *Revista Digital Universitaria* (Universidad Nacional Autónoma de México) [<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num5/art35/#>] [publicación electrónica - <http://www.revista.unam.mx/>]
- Linares, E., R. Bye, N. Ortega, A.E. Arce. 2017. *Quelites: Sabores y saberes del Estado de México*. México, CDMX: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Montes García E. S. 2017. *Diseño de protocolo para el manejo de ratones cepa C57BL/6*. Instituto Tecnológico de Colima. Villa de Alvarez: SEP. Disponible en <https://dspace.itcolima.edu.mx/bitstream/handle/123456789/809/EVELYN%20SARAH%20MONTES%20GARC%c3%8dA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Josefina Consuelo Morales-Guerrero, Reina Rosas-Romero, Ma. Amanda Gálvez-Mariscal, Fabiola Ayala-Alcántara and Héctor Bourges-Rodríguez. Glycemic Index and Glycemic Load of two dishes prepared with Alache (*Anoda cristata*) and Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) Plants from the Traditional Mexican Diet". *J Med Food* 26 (6) 2023, 416–421. DOI: 10.1089/jmf.2022.0091
- NOM-062-ZOO-1999. Norma oficial mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- PNOMA-UNAM-UNIPREC-0. Procedimiento normalizado de operación para el manejo de animales. UNIPREC. Documento interno.
- PNOMS-UNAM-UNIPREC-01. Procedimiento normalizado de operación para la toma de muestras sanguíneas. UNIPREC. Documento interno.
- PNONE-UNAM-UNIPREC-01. Procedimiento Normalizado de Operación para la realización de Necropsias. UNIPREC. Documento interno.
- PNOVA-UNAM-UNIPREC-01. Procedimiento Normalizado de Operación para vías de administración. UNIPREC Documento interno.
- Ramos Mora, D. M. 1989. Determinación de la composición nutricional y toxicológica de los quelites: *Anoda cristata*, *Crotalaria pumila*, *Euphorbia graminea* y *Leucaena macrophylla*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. <http://132.248.9.195/pmig2017/0104894/Index.html>
- Reinauer, H., Philip D. Home, Ariyur S. Kanagasabapathy y Claus-Chr Heuck. 2005. Diagnóstico y Monitorización de la Diabetes Mellitus desde el Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. Momento Médico Interamericano s. I. 05MS0911-09/05. Madrid, España.
- Rendón B., R. Bye and J. Núñez-Farfán. 2001. Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schl. (Malvaceae) in central Mexico: uses, management and population differentiation in the community of Santiago Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico. *Economic Botany* 55(4) 545-554.
- Shamah-Levy T, E. Vielma-Orozco, O. Heredia-Hernández, M. Romero-Martínez, J. Mojica-Cuevas, L. Cuevas-Nasu, J.A. Santaella-Castell, J. Rivera-Dommarco. 2020. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Shamosh Halabe, S. 2014. Definición de principios alimentarios saludables, a partir de los usos y costumbres de la alimentación ancestral y de la actual en México. Tesis de Doctorado, Instituto de Investigaciones Filosóficas, UNAM. México.

[http://132.248.9.195/ptd2014/mayo/0713020/
Index.html](http://132.248.9.195/ptd2014/mayo/0713020/Index.html)

Tomoda, M., Ryoko, G., Shimizu, N., & Yamada, H. 1989.
An anti-complementary mucilage from the leaves
of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. *Chem. Pharm.
Bull.* 37(11), 3029–3032.
<https://doi.org/10.1248/cpb.37.3029>

WHO 2022. Countries with the highest number of
diabetics worldwide in 2021 [https://www.statista.
com/statistics/281082/countries-with-highest-
number-of-diabetics/](https://www.statista.com/statistics/281082/countries-with-highest-number-of-diabetics/)