



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE EXTRACTOS  
OBTENIDOS DE *Colubrina elliptica* EN UN MODELO  
DE RATAS HIPERGLICEMICAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

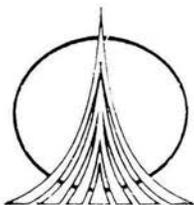
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

**ADRIANA RIOS DOMINGUEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUBEN MARROQUIN SEGURA

ASESOR DE TESIS: M.C. MAURILIO FLORES PIMENTEL



Unidad en la Diversidad.  
Zaragoza Frente al Siglo XXI

MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

*A ti Papá*

*Porque tus consejos siempre fueron encaminados a mi superación, porque tu lucha para salir y sacarnos a adelante sin reparar en desvelos y fuertes jornadas de trabajo han sido un ejemplo a seguir y una muestra del gran amor que nos tienes, aunque con nada podré compensar lo que me has dado, esto es solo una forma de corresponder a tanto esfuerzo. Gracias por hacer de mí lo que soy...*

*Te amo papá*

*A ti Mamá*

*Porque aunque tu persona ya  
no este aquí, las semillitas que  
dejaste en mí, ya han dado  
muchos frutos y esto es solo uno  
de ellos.*

*Porque tus consejos nunca han de  
morir...*

*Gracias mamá*

*Alex:*

*¿Recuerdas como me refugiaba en ti cuando estábamos solos?*

*Siempre cuidaste de mi, y aunque no estemos juntos, se que siempre podré contar contigo.. te quiero mucho.*

*Pilla*

*Porque siempre has estado conmigo, y puedo ver en ti a una amiga con quien compartir alegrías y tristezas, que me soporta pero sobre todo que me quiere tanto... como yo a ti.*

*Gracias a ambas por esos dos pequeños grandes motivos para luchar y salir adelante...*

*Queny y Yolis*

*Porque desde que llegaron han llenado mi vida de alegría.  
Chiquitos, son mi adoración.*

*A Ricardo*

*Por el enorme apoyo que siempre me brindaste durante la carrera, por estar siempre a mi lado y saber que cuento contigo en todos los aspectos, pero sobre todo por estos 5 años y 4 meses que me han hecho tan feliz.*

*Te amo Rick*

*A mis amigos*

*Ely, Magas, Arys, Maritza, Oscar...*

*Porque a pesar del tiempo y de los distintos  
rumbos que nuestras vidas han tomado desde que  
terminamos la carrera nuestra amistad ha  
perdurado.*

*Lolis, Landy, Magda*

*Por el tiempo compartido en el laboratorio, fue un  
placer conocerlas*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Rubén Marroquín Segura, por su comprensión, paciencia y sobre todo el gran apoyo para la realización del presente trabajo.*

*Al M. en C. Luis A. Mora Guevara por su colaboración en el análisis estadístico de resultados.*

*A la M. en C. Martha Mercedes García Burciaga por su invaluable colaboración en los ajustes de dosis para los ensayos realizados.*

*Al M. C. Mauricio Flores Pimentel por el tiempo y dedicación que me brindó en el manejo de animales.*

*Al M. en C. Arturo E. Cano Flores por su gran aportación al proyecto en la separación de la planta en diferentes fracciones.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Biol. Ma. Del Pilar Santos Romo  
M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara  
M. en C. Ángel García Sánchez*

*Por todos sus consejos, sugerencias y  
apoyo encaminado a enriquecer mi  
trabajo.*

*A todos gracias.*

## INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Marco teórico	
III. 1 Antecedentes históricos	3
III. 2 Diabetes mellitus	6
III. 2. 1 Definición	6
III. 2. 2 Clasificación	6
III. 2. 3 Diabetes tipo 2	7
III. 2. 4 Epidemiología	7
III. 3 Fisiología	8
III. 4 $\alpha$ -amilasa	8
III. 5 Insulina	9
III. 6 Antagonismo fisiológico de insulina y glucagon	10
III. 7 Fisiopatología en la diabetes mellitus tipo 2	10
III. 8 Detección	11
III. 9 Diagnóstico	11
III. 10 Tratamiento	12
III. 11 Familia <i>Rhamnaceae</i>	16
IV. Planteamiento del problema	17
V. Objetivos	17
VI. Hipótesis	18
VII. Diseño experimental	18
VIII. Variables	18
IX. Material y métodos	19
X. Ensayo biológico	21
XI. Técnicas	22
XI. 1 Glucosa	22
XI. 2 $\alpha$ -amilasa	24
XII. Resultados	26
XIII. Análisis de resultados	45
XIV. Conclusiones	46
XV. Sugerencias	46
XVI. Referencias bibliográficas	47



## I. Resumen

**ANTECEDENTES.** La diabetes mellitus es una enfermedad que se caracteriza por hiperglucemia crónica, por lo que el estudio de las plantas que presentan actividad hipoglucemiante representan una alternativa más para su tratamiento, aportando las bases necesarias para el aislamiento e identificación de sustancias hipoglucemiantes activas que justifiquen su uso terapéutico con el fin de mantener la concentración de glucosa dentro de los niveles adecuados.

**OBJETIVO.** Evaluar el efecto hipoglucemiante de extractos obtenidos de *Colubrina elliptica* en un modelo de ratas hiperglicémicas.

**MÉTODO.** Se llevó a cabo un estudio de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo de una población de 140 ratas wistar hembras, con un peso de 220 – 450 g, sanas.

Las variables independientes fueron el extracto y dosis del mismo, así como las infusiones y el volumen administrado. Mientras que la variable dependiente fueron los niveles de glucosa en sangre. Los resultados fueron tratados estadísticamente mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 10 para windows. La significancia de las diferencias entre las medias de los grupos estudiados fue establecida por un análisis de varianza (ANOVA) manejando una confianza de 95%,  $\alpha = 0.05$  y  $P < 0.05$ .

**RESULTADOS.** La *Colubrina elliptica* posee actividad hipoglucemiante, dicha actividad se observó cuando se realizó un estudio piloto de una infusión de 14 g de corteza en 50 mL de agua hervida por 1 minuto y se comparó con dos grupos como controles positivos (animales tratados con tolbutamida y glibenclamida) y un grupo control. El efecto hipoglucemiante se observó a los 60 y 120 minutos (al probar los extractos, las muestras se tomaron a estos tiempos). Los resultados de dicho estudio dieron pauta para la separación de la planta, de la cual se obtuvieron diferentes extractos, y de aquí se derivó el presente estudio.

Se probaron los extractos etanólico, metanólico y aguas madres del extracto etanólico y la glucemia no disminuyó en forma significativa, al contrario hubo un aumento en la concentración a los 60 minutos para las aguas madres al manejar una dosis de 20 mg / Kg de peso.

Al no observar una disminución en la glucemia se procedió a evaluar el extracto etanólico en dosis superiores, sin embargo, los resultados de este ensayo tampoco revelaron la actividad de la planta, al contrario la glucemia aumento a los 120 minutos en el grupo tratado con 80 mg de extracto / Kg de peso.

Al no obtener resultados que sustentaran el objetivo del proyecto se probó la planta en infusión con el fin de emitir una conclusión, para esto se prepararon diferentes infusiones en las cuales se modificó la cantidad de corteza y tiempo de cocción.

Al realizar el ensayo de la infusión preparada en igual forma que el estudio piloto, el efecto se observó a los 180 minutos después de administrar 0.25 mL de infusión, mientras que en las otras dos infusiones probadas la glucemia no disminuyó, solamente hubo un aumento en la concentración de alfa amilasa en la infusión preparada a partir de 28 g de corteza en 50 mL de agua hervida por 1 minuto.

**CONCLUSIONES.** La *Colubrina elliptica* posee actividad hipoglucemiante, dicha actividad es dependiente del tratamiento que se da a la planta, así como también de la cantidad de corteza utilizada. Los niveles de alfa amilasa presentan una tendencia a elevarse y esta al parecer es dependiente de la dosis y tipo de extracto, es probable que esta enzima juegue un papel importante en el enmascaramiento del efecto hipoglucemiante (dada su actividad). No se observó evidencia de la actividad de la planta en los extractos probados, por lo que los resultados indican que la actividad puede estar dada por un grupo de sustancias destinadas a ese fin. La dosis, así como el tratamiento, son factores determinantes para que esta se presente.



## II. Introducción

Uno de los problemas más importantes a nivel mundial, que muestra elevados índices de prevalencia y mortalidad que por ende se convierte en un serio problema de salud pública que afecta a todas las sociedades sin importar su estado de desarrollo es la diabetes mellitus. Alrededor del 8.2% de la población entre 20 y 69 años padece diabetes y, cerca del 30% de los individuos afectados desconoce que la tiene. Esto significa que en nuestro país existen más de cuatro millones de personas que padecen esta enfermedad, de las cuales poco más de un millón no han sido diagnosticadas. La mortalidad por esta causa muestra un incremento sostenido durante las últimas décadas, hasta llegar a ocupar el tercer lugar dentro de la mortalidad general.

El diagnóstico precoz y un buen control de la enfermedad, encaminado a mantener la glucosa dentro de los niveles adecuados ( 60 - 110 mg / dL ), son condiciones necesarias para que el enfermo con diabetes mellitus pueda tener una buena calidad de vida al evitar o retrasar las complicaciones y disminuir la mortalidad por esta causa.

El tratamiento farmacológico incluye agentes hipoglucemiantes orales y/o inyecciones de insulina, sin embargo, por muchos años en México se han utilizado plantas en el tratamiento de dicho padecimiento. La información etnobotánica mundial reporta al menos 800 plantas utilizadas en el control de la diabetes y aproximadamente 150 de éstas existen en México; no obstante, solamente un pequeño número de ellas han sido estudiadas y no existen datos científicos que sustenten su actividad hipoglucemiante, tal es el caso de la *Colubrina elliptica*.

La *Colubrina elliptica* conocida también como “Amole”, “Palo de Amole”, “Sacna-che” o “Palo de arco”, se ha utilizado para el tratamiento de diversos padecimientos como: fiebre, úlceras gástricas y para nuestro interés, se tiene el conocimiento de que en regiones muy localizadas de Tamaulipas y el norte de Veracruz se utiliza como una alternativa en el tratamiento de la diabetes. De aquí la importancia de valorar el efecto hipoglucemiante de diferentes fracciones obtenidas de dicha planta, a fin de ofrecer una alternativa más en el control de la enfermedad, con el propósito de reducir las complicaciones que la acompañan y por consiguiente los índices de mortalidad.



### III. MARCO TEÓRICO

#### III.1 Antecedentes históricos

En 1862, George Ebers descubrió en una tumba de Tebas, en Egipto, un pequeño papiro que fue escrito aproximadamente en el año 1550 a.C. Este documento describe la enfermedad que se caracteriza por la abundante emisión de orina y recomienda para su tratamiento el uso de extracto de plantas. Hasta la actualidad, el papiro de Ebers constituye la primera referencia histórica de la diabetes, hace nada menos que 3500 años.

Los médicos hindúes, por otra parte, describen en los libros que datan del año 600 a.C. la existencia de unos enfermos que padecen de sed, adelgazan rápidamente, pierden fuerzas y emiten una orina que "atrae a las hormigas por su sabor dulce".

Estas referencias significan que los síntomas de la enfermedad son conocidos desde hace muchísimos años.

El término *diabetes* (que significa "pasar a través") no fue acuñado hasta el siglo II a.C. por Aretaeo de Capadocia. Este personaje tiene un lugar de honor en esta pequeña historia gracias a la excelente definición que hizo de la enfermedad: "La diabetes es una delicada afección en la que las carnes se funden por la orina. Los pacientes nunca paran de beber agua; su vida es corta y penosa; padecen náuseas, inquietud, una sed ardiente, y no tardan mucho tiempo en morir".<sup>35</sup>

Galeno, en el siglo II, interpretó que la diabetes era producida por la incapacidad del riñón para retener agua, y esta idea, en cierto modo errónea, persistió durante 15 siglos.

Von Hohenheim, que alrededor de 1520 evapora la orina y describe un residuo salino, interpretando que la diabetes es causada por una enfermedad del riñón, el cual extrae una excesiva cantidad de sal del organismo.

A Von Hohenheim le faltó la osadía que tuvo Thomas Willis en 1674, el cual probó la orina de los diabéticos, redescubriendo (200 años después que los hindúes) que la orina tenía sabor dulce.

No fue sino hasta 1775 en que Mathew Dobson descubrió que el sabor dulce de la orina era debido a la presencia de azúcar, comprobándolo igualmente en la sangre de los pacientes diabéticos. Dobson concluyó que "la pérdida de peso y fuerza de los diabéticos era la consecuencia de la pérdida de material nutritivo por la orina".

Los grandes avances en la fisiología que se producen en el siglo XIX remueven una gran cantidad de conceptos en medicina que se mantenían aún desde la época romana. Los experimentos de Claude Bernard demuestran en 1848 que el azúcar puede ser formado en el hígado a partir de proteínas y lípidos y ser secretado a la circulación, y que éste fenómeno (denominado gluconeogénesis) se produce incluso cuando la dieta está exenta de azúcar.<sup>35</sup>



En 1869, Paul Langerhans, que tenía entonces 22 años publicó su tesis doctoral sobre histología del páncreas. Langerhans describió unos grupos de células en forma de pequeñas islas, independientes del resto de la estructura de la glándula y cuya naturaleza y función (según propias palabras) “no soy capaz de explicar”.

En 1889 persistía la discusión sobre si el páncreas era o no necesario para la vida. En este caso, la polémica la mantenían Von Mering y Minkowsky, al realizar pancreatomecías en animales comprobaron que la orina de estos tenía gran cantidad de azúcar y, después de repetir en varias ocasiones el experimento, escribió “después de la pancreatomecía total, los perros se vuelven diabéticos”. No se trata (sigue diciendo) de una glucosuria transitoria, sino que corresponde a la forma más grave de diabetes en humanos”.

Estos experimentos apuntaban sin ninguna duda al páncreas como principal responsable de la diabetes, aunque faltaba todavía el cómo. El propio Minkowsky contribuyó a resolverlo llevando a cabo autotransplantes de páncreas.<sup>36</sup>

Todo hacía suponer que el páncreas sintetizaba una sustancia que se vertía a la sangre y cuya ausencia era responsable de la diabetes. La búsqueda de esta sustancia fue abordada por diferentes grupos de investigadores y, aunque la historia ha atribuido los honores del descubrimiento de la insulina a Frederick Grant Banting y Charles Herbert Best, otros dos investigadores merecen al menos un pequeño recuerdo.

En 1908, Zuelzer publicó que la inyección de un extracto pancreático que había obtenido provocaba en sus pacientes convulsiones. Estas convulsiones fueron interpretadas como un efecto tóxico, cuando lo más probable es que se tratara del síntoma de hipoglicemia. Zuelzer abandonó sus experimentos al empezar la Primera Guerra Mundial. Otro investigador tampoco favorecido por la fortuna fue Poulescu, quien en Rumania elaboró un preparado que tenía efectos hipoglicémicos cuando lo inyectaba a perros. La guerra retrasó la publicación de sus resultados hasta Julio de 1921, momento en el que culminaban las experiencias de Banting y Best, Poulescu reclamó posteriormente sus derechos, pero fue en vano. El descubrimiento de la insulina por Banting y Best dio principio a la endocrinología contemporánea.<sup>36</sup>

En 1935, el médico danés Hans Christian Hagedorn descubrió la insulina de acción prolongada.

Al finalizar la década de los cincuenta, se descubrieron los efectos hipoglicémicos de algunos derivados sulfamídicos, lo que originó todo un grupo de sustancias hipoglicémicas orales como el de las sulfonilureas. Los estudios los realizaron Franke, Fuch Berson y Yalow.

Debido a estudios de Framingham, a partir de 1948 se le da importancia a las complicaciones cardiovasculares de la diabetes mellitus; en 1963, Kipins, Karam y Forsham manifiestan que la obesidad agrava la diabetes.



En 1960, Niell y Smith describieron la estructura química de la insulina humana, con lo cual se modifica la terapéutica de la diabetes; antes, en 1953, F. Sanger determinó la estructura química de la insulina de bovino.

Hacia 1972, se empezó a sospechar la existencia de una reacción inmunitaria en los mecanismos de la diabetes tipo I; entonces por primera vez, en la sangre de diabéticos, se detectaron anticuerpos contra los islotes de Langerhans, lo que originó estudios de biología molecular.

En 1982, en Estados Unidos se aprobó la insulina humana para uso general. Antes de ese año, la insulina se obtenía de cerdos y de vacas, para producir insulina humana. Luego se descubrió cómo transferir el gen de la insulina a las bacterias *E. Coli*, las cuales se convirtieron en fábricas vivas de insulina.

Desde hace un decenio se realizan numerosos estudios cuyo propósito es simular la liberación fisiológica de la insulina; como reproducciones "biológicas" que recurren a injertos de páncreas, de islotes de Langerhans, sistemas mecánicos, como los páncreas artificiales, las bombas de insulina etc., gran cantidad de alternativas que van dirigidas a proporcionar una calidad de vida a las personas que sufren este padecimiento, sin embargo tal parece que a pesar de todo la historia seguirá aportando mas, ya que la epidemiología revela que los índices de prevalencia y mortalidad siguen aumentando.<sup>35 36</sup>



## III. 2 DIABETES MELLITUS

### III.2.1 Definición

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria con participación de diversos factores ambientales, caracterizada por un estado de hiperglucemia, debido a una deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas.<sup>17</sup>

### III.2.2 Clasificación

La clasificación está basada en la etiología y fue revisada de acuerdo a recomendaciones del comité de expertos en diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus en 1997.<sup>21, 27</sup>

Tabla 1

CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
Diabetes mellitus tipo 1	La destrucción de las células $\beta$ del páncreas provoca una deficiencia absoluta de insulina.
Diabetes mellitus tipo 2	Existe una deficiencia relativa de la insulina hasta un defecto predominante de la secreción de insulina con resistencia a la misma.
Otros tipos específicos	Asociada a enfermedades por defectos genéticos, alteraciones de páncreas, endocrinopatías, por fármacos, etc.
Diabetes mellitus gestacional	Se presenta a partir de la semana 24-28 de la gestación en grupos de alto riesgo como los hispanos.

Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.



### III.2.3 Diabetes tipo 2

Por su magnitud y trascendencia, la diabetes mellitus tipo 1 y 2, son las más importantes, principalmente la de tipo 2, la cual representa aproximadamente el 90% de todas las formas clínicas y constituye un importante problema de salud pública principalmente en personas mayores de 40 años, tanto a nivel internacional como nacional e institucional.<sup>2</sup>

La diabetes mellitus tipo 2, es la forma clínica más frecuente de diabetes y se caracteriza por los siguientes rasgos: alta frecuencia familiar; aparición relativamente tardía, por lo general en la edad adulta; asociación estadística con obesidad e hipertensión arterial esencial, desarrollo relativamente lento de secuelas en comparación con la diabetes mellitus tipo 1, baja tendencia a la cetosis, y una mayor tendencia a la hiperosmolaridad no cetósica.

Es una condición heterogénea que no puede atribuirse a un solo mecanismo patológico; se caracteriza por varias anormalidades metabólicas, incluyendo una función deficiente de las células  $\beta$  y la resistencia a la insulina en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado, originando anormalidades que causan hiperglucemia crónica y, a largo plazo graves complicaciones.<sup>1, 26</sup>

### III.2.4 Epidemiología

La diabetes mellitus representa una de las enfermedades de mayor proporción dentro de los padecimientos crónico-degenerativos. Según estimaciones actuales de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la OPS (Organización Panamericana de la Salud), se calcula que existen a nivel mundial alrededor de 135 millones de diabéticos y se espera que esta cifra se eleve a 300 millones en los próximos 25 años. Se prevee un aumento en países desarrollados del 40%, mientras que en países en desarrollo la frecuencia será del 70%. Para 1995 en México había 3.8 millones de adultos diabéticos, ocupando el noveno lugar dentro de los 10 países con mayor número de personas con esta enfermedad; para el año 2025 se calcula que existirán 11.7 millones, ocupando el 7º lugar en orden de frecuencia con mayor número de personas diabéticas.

Actualmente México ocupa el primer lugar en América Latina con mayor incremento en la prevalencia (7.7-12.3%). La mortalidad muestra un incremento sostenido durante las últimas décadas hasta llegar a ocupar en 1998, el 3º lugar dentro de la mortalidad general. A fin de enfrentarse a tan grave problema se debe poner énfasis en procedimientos para su detección, diagnóstico, tratamiento y control para contribuir a la reducción de la frecuencia que actualmente se registra y así evitar o retrasar las complicaciones disminuyendo la mortalidad por esta causa.<sup>6, 20, 28</sup>



### III.3 FISIOLÓGÍA

La glucosa es el energético principal del organismo y se obtiene básicamente de la alimentación aunque puede producirse durante el propio metabolismo del cuerpo.

Los azúcares simples como la glucosa son utilizados con rapidez, mientras que los demás nutrimentos, como las proteínas, cuando se ingieren en mayor cantidad que la necesaria, son convertidos de manera gradual a glucógeno y almacenados en hígado para ser usados en la conservación de los valores séricos normales de la glucosa entre comidas. La conservación de los valores séricos normales en ayunas depende de la interacción de cierto número de estructuras corporales, entre ellas el hígado, los tejidos periféricos y las hormonas, todos los cuales actúan para elevar o reducir la glucosa en la sangre.

Por su parte, el hígado tiene importancia vital, ya que la almacena como glucógeno (glucogénesis) y lípidos cuando la captación es excesiva, además, si el suministro es escaso, puede revertir el glucógeno en glucosa (glucogenólisis) y también sintetizar glucosa de algunos aminoácidos ó del glicerol proveniente de la degradación de lípidos (gluconeogénesis). La regulación hepática es modificada por varias hormonas, incluyendo de manera primaria la *insulina*. Las hormonas involucradas en dicha regulación son principalmente tiroideas y adrenocorticales (en particular glucocorticoides), adrenalina y glucagon, el último promueve la producción de glucosa y controla su almacenaje.<sup>31</sup>

### III.4 $\alpha$ - AMILASA

La  $\alpha$  - amilasa es una enzima que pertenece a la clase de las hidrolasas con un peso molecular bajo ( 50 000 ). Las principales fuentes tisulares de esta enzima son las glándulas salivales y las células acinares del páncreas.

Durante largo tiempo se sospechó que la amilasa del suero tal vez procediera de otros tejidos, además del páncreas y de las glándulas salivales, ya que la extracción de estos órganos en animales no alteró sensiblemente los niveles en el suero y orina, mas tarde se supo que la actividad de la amilasa alfa no es específica para estos tejidos, ya que también se encuentra en el epitelio intestinal, trompas de falopio, mucosa del cuello uterino, endometrio músculo estriado e incluso en hígado y que las propiedades catalíticas de la enzima presente en hígado son parecidas a la alfa amilasa pancreática, es capaz de degradar glucogeno para liberar glucosa a circulación. La reacción enzimática que cataliza la amilasa alfa es la hidrólisis aleatoria de los enlaces glucosídicos del almidón, glucógeno y otros polímeros de la glucosa.<sup>37, 38, 39,40</sup>

Al intentar separar la alfa amilasa en sus fracciones isoenzimáticas, se han identificado dos isoenzimas distintas. Se supone que la amilasa pancreática ( P ) se deriva del páncreas, mientras que las amilasas salivales ( S ) son secretadas por varios tejidos, incluyendo glándulas salivales, pulmón, huesos, ovarios y tiroides. En el suero de un adulto, cerca de 40 % de la actividad total de la amilasa se debe al tipo P y el restante 60 % se deriva del tipo S.

Hay diversas fracciones de isoenzimas relacionadas con cada glándula. Las isoenzimas salivales se designan como S1, S2 y S3, mientras que las pancreáticas P1, P2 y P3.

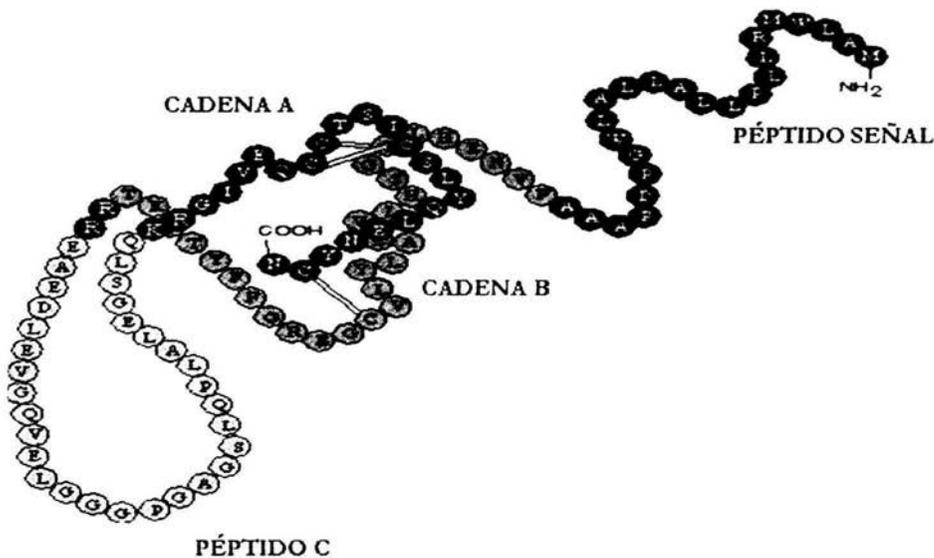
S1 y P2 constituyen la mayor parte de actividad de amilasa en suero normal. Sin embargo, la aparición de la fracción P3 tiene mayor significado clínico. Aparentemente no se detecta en suero normal y sólo está presente en casos de pancreatitis aguda.<sup>32,34</sup>



### III.5 INSULINA

La insulina se sintetiza en el páncreas exócrino por las células  $\beta$  de los Islotes de Langerhans en forma de una larga cadena protéica constituida por tres fragmentos llamada preproinsulina (Fig 1), antes de salir del páncreas se produce la escisión de los dos primeros fragmentos de la cadena dando origen a la proinsulina que consiste en una sola cadena de 86 aminoácidos y que presenta solamente el 5% de la actividad de la insulina. La molécula de proinsulina consiste en las cadenas A y B que están conectadas por puentes disulfuro y por un péptido conectivo llamado péptido C. Con la siguiente ruptura de la cadena queda libre el péptido C, residuo de 31 aminoácidos, sin actividad biológica conocida y la molécula de insulina resultante es una proteína que consiste en 51 aminoácidos contenidos dentro de dos cadenas peptídicas: A, con 21 aminoácidos y una cadena B, con 30 aminoácidos, conectadas por puentes disulfuro. Cantidades iguales de insulina y péptido C son liberados dentro de la circulación después de un estímulo neural, dietético u hormonal. Solamente pequeñas cantidades de proinsulina se encuentran en la circulación.

La insulina manifiesta su efecto en las células activando unos receptores situados en la membrana, lo que se traduce en la activación de los transportadores de glucosa que se encargan de la introducción de este compuesto en la célula.<sup>25 33</sup>



**FIGURA 1.** Estructura de la pre-pro-insulina que indica al péptido señal (azul), péptido C (verde), cadena A (rojo) y cadena B (naranja).



### III.6 ANTAGONISMO FISIOLÓGICO DE INSULINA Y GLUCAGON

La insulina y el glucagon tienen efectos opuestos. La insulina inhibe la proteólisis, lipólisis, gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado; aumenta la síntesis proteica en el músculo y acelera la síntesis de triglicéridos en las células adiposas por lo tanto, actúa como único agente corporal hipoglucémico, mientras que el glucagon estimula la liberación de glucosa (glucogenólisis) al medio obteniendo un resultado neto, la homeóstasis de la glucosa.

Para emplearse de manera apropiada, la glucosa debe entrar en la célula, para lo cual se requiere insulina.<sup>25</sup>

### III.7 FISIOPATOLOGIA EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

La diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por varias anomalías metabólicas, incluyendo una función deficiente de las células  $\beta$  y la resistencia a la insulina en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado.

Los conocimientos actuales permiten suponer que tanto la resistencia a la insulina como el trastorno en la secreción pancreática de insulina tienen un origen genético en los individuos predispuestos a la diabetes tipo 2.

Cuando la incapacidad del páncreas para incrementar su secreción de insulina en respuesta a la demanda aumentada que le impone la disminución en la sensibilidad a la insulina alcanza un nivel crítico, aparece, primero, la intolerancia a la glucosa y después la hiperglucemia en ayunas.<sup>1</sup>

La resistencia a la insulina reduce dramáticamente la absorción de glucosa en el tejido periférico resultando en una sobreproducción de glucosa por el hígado; ambos defectos contribuyen a mantener la hiperglucemia. En etapas tempranas del proceso de enfermedad, la resistencia a la insulina ya está presente y los pacientes son hiperinsulinémicos aunque no hiperglucémicos. Sin embargo, con el tiempo los mecanismos compensatorios fallan y los pacientes progresan a una diabetes mellitus tipo 2 abierta, presentando los síntomas clásicos: polifagia, polidipsia y poliuria.

Sin embargo, el cuadro no se presenta exacerbado y a diferencia de la diabetes tipo 1 no se presenta cetoacidosis, la hiperglucemia aumenta la resistencia a la insulina y acelera el agotamiento de la reserva secretora de dicha hormona. La deficiencia de insulina se manifiesta por adelgazamiento progresivo del paciente, aunque este no reduzca su consumo de calorías. Algunos pacientes con diabetes mellitus de muy larga duración desarrollan deficiencia casi total de la secreción de insulina, suelen estar desnutridos, con intensificación de los síntomas de diabetes y en descontrol metabólico.<sup>1,2</sup>



### III.8 DETECCIÓN

Son candidatos para realizar un escrutinio a través de una glucosa capilar y posteriormente una glucosa plasmática en ayuno, aquellos individuos que tengan uno ó mas factores de riesgo de los que a continuación se señalan.

- Individuos de 45 años o más.
- Antecedentes familiares de diabetes mellitus por parte del padre, madre o hermanos.
- Individuos que pertenecen a grupos étnicos de alto riesgo (nativos americanos, méxico-americanos, hispánicos).\*
- Individuos obesos (peso corporal  $\geq 20$  % del peso deseable ).
- Tabaquismo
- Mujeres que tienen hijos al nacer con peso igual o mayor a 4 Kg.
- Individuos con hipertensión arterial ( $\geq 140/90$  mmHg)
- Individuos con dislipidemia ( Triglicéridos  $\geq 250$ mg /dL y HDL colesterol  $\leq 35$  mg/ dL).

\* La ascendencia hispánica para fines del programa ( por estar casi toda la población incluida) no se considerará como criterio de inclusión al tamizaje. Este factor será válido solo en países con comportamiento étnico heterogéneo.<sup>2,17</sup>

### III.9 DIAGNÓSTICO

En los pacientes con síntomas de diabetes no controlada, como poliuria, polidipsia, polifagia, nicturia y pérdida de peso y una glucemia aleatoria evidente  $>200$  mg/dL es fácil diagnosticar diabetes. También lo es identificar a los pacientes jóvenes con diabetes de tipo 1 de nueva aparición que acuden con cetoacidosis diabética. Sin embargo, el paciente asintomático con diabetes de tipo 2 por lo general permanece sin un diagnóstico durante varios años. El paciente promedio con diabetes de tipo 2 “de nueva aparición” en realidad ha padecido esta enfermedad durante 4 a 7 años antes de realizar el diagnóstico. Así, para el momento del diagnóstico es común que muestre ya retinopatía, neuropatía o nefropatía diabética.

Se establece el diagnóstico de diabetes, si cumple cualquiera de los siguientes criterios:

- ❖ Presencia de síntomas clásicos y una glucemia plasmática casual  $>200$  mg/dL.
- ❖ Glucemia plasmática en ayuno  $>126$  mg/dL.
- ❖ Glucemia  $>200$  mg/dL a las dos horas después de carga oral de 75g de glucosa disuelta en agua. En ausencia de hiperglicemia inequívoca, con descompensación metabólica aguda, el diagnóstico debe confirmarse repitiendo la prueba otro día.



Se establece el diagnóstico de glucosa anormal en ayuno cuando:

1. La glucosa plasmática o en suero es  $> 110$  mg/dL y  $< 126$  mg/dL.

Se establece el diagnóstico de intolerancia a la glucosa cuando:

- La glucosa plasmática, a las dos horas poscarga, es  $>140$  mg/dL y  $<200$  mg/dL.<sup>17</sup>

Diabetes gestacional.

Antes de efectuar la prueba de tolerancia a la glucosa, se deberá realizar la prueba de detección en toda embarazada entre las semanas 24 y 28 de gestación. Si una hora después de una carga de 50 g de glucosa por vía oral, se encuentra una glucemia plasmática  $>140$  mg/dl, se efectuará la prueba diagnóstica.

Se establece el diagnóstico de diabetes gestacional, si durante las semanas 24 a 28 del embarazo se presentan dos o más de los siguientes valores:

2. En ayuno  $>105$  mg/dl; y, después de una carga de glucosa en ayuno de 100g, valores superiores a 190 mg/dl a la hora poscarga, 165 mg/dl a las dos horas poscarga y 145 mg/dl a las tres horas.

### III.10 TRATAMIENTO

#### OBJETIVOS

El tratamiento de la diabetes tiene como propósito aliviar los síntomas, mantener el control metabólico, prevenir las complicaciones agudas y crónicas, mejorar la calidad de vida y reducir la mortalidad por esta enfermedad o por sus complicaciones.

#### ESTRATEGIAS DE MANEJO

TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Educación para la salud</li><li>• Plan alimentario y control de peso</li><li>• Actividad física</li><li>• Tratamiento combinado</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agentes hipoglucemiantes orales (secretagogos de insulina).</li><li>• Antihiperoglucemiantes</li><li>• Sensibilizadores de insulina</li><li>• Insulina</li><li>• Terapia combinada</li></ul>

Un componente esencial del tratamiento es tener un buen control mediante exámenes repetidos de sangre y orina para valorar la glucosa.<sup>2</sup>



## CANDIDATOS A TRATAMIENTO CON INSULINA

La única indicación terapéutica actual para el uso de la insulina es para enfermos con deficiencia absoluta de la misma, o en quienes tal deficiencia produce falta de respuesta al tratamiento con dieta, ejercicio físico o hipoglucemiantes.

No existen reglas simples para su uso, ya que la diabetes es heterogénea y de fisiopatología complicada. Aún más, la respuesta terapéutica dependerá de la etapa de la enfermedad y de la presencia de complicaciones concomitantes.<sup>18</sup>

## HIPOGLUCEMIANTES ORALES

Se incluyen diversos medicamentos con diferentes mecanismos de acción, a saber:

- Los secretagogos de insulina: nateglinida, sulfonilureas y repaglinida.
- Antihiperoglucemiantes: los inhibidores de las alfa-glucosidasas, las biguanidas y las tiazolidinedionas (rosiglitazona y pioglitazona).

Los secretagogos de insulina son medicamentos que estimulan a los islotes  $\beta$  del páncreas para incrementar la liberación de insulina, mientras que los antihiperoglucemiantes tienen diferentes mecanismos de acción, entre los que se incluye retraso en la absorción de carbohidratos en la luz intestinal (inhibidores de la alfa-glucosidasa) o aumento de la sensibilidad a la glucosa (biguanidas y tiazolidinedionas). Estos medicamentos se denominan antihiperoglucemiantes debido a que tienen un mecanismo de acción diferente al incremento de la insulina circulante y tienen menor probabilidad de causar hipoglucemia.

### Secretagogos

#### *Nateglinida y meglitinidas*

La nateglinida es un derivado de la D-fenilalanina, que se dirige principalmente a controlar los picos de hiperglucemia posprandial. Estimula directamente a las células beta del páncreas para que incrementen la secreción de insulina.

A diferencia de otros hipoglucemiantes orales, en especial las sulfonilureas, el tiempo de fijación y de separación del fármaco al receptor es muy corto con nateglinida (cerca a los 2 segundos), a diferencia de la glibenclamida, con un tiempo de fijación de varios minutos, por lo que los efectos insulínotropicos de nateglinida se revierten con rapidez. Esta característica farmacocinética hace poco probable la incidencia de hipoglucemia con nateglinida. La estimulación de liberación de insulina por nateglinida también depende de la concentración de la dosis. La glucosa sensibiliza a las células beta, lo que significa que a mayores concentraciones de glucosa, el fármaco tendrá un efecto más marcado y con bajas concentraciones su efecto disminuirá.

#### *Sulfonilureas*

Las principales sulfonilureas son las siguientes: tolbutamida, clorpropamida, glibenclamida y glimepirida.

Este tipo de hipoglucemiantes orales aumentan la secreción de insulina por el páncreas y su captación por los receptores producen hipoglucemia. En los pacientes de reciente diagnóstico, por lo general, el organismo desarrolla un hiperinsulinismo compensatorio para lograr que la glucosa llegue al interior de la célula y sea convertida en almacén de energía. Por éste motivo, el uso de hipoglucemiantes orales como primera medida terapéutica está contraindicado, pues éstos terminarán por agotar el páncreas.



## Antihiperglucemiantes

### *Inhibidores de las alfa-glucosidasas*

La acarbosa es un inhibidor de alfa-glucosidasas que actúa como pseudotetrasacárido y que compete con los carbohidratos por la unión con las alfa-glucosidasas, por lo que retrasa la absorción de los carbohidratos simples, disminuyendo la disponibilidad de los monosacáridos en la luz intestinal, normaliza o reduce los picos de hiperglucemia posprandial, mejora la excursión posprandial de la glucemia, mejorando el metabolismo intermedio.

### *Biguanidas*

La biguanida que actualmente se recomienda es la metformina. Es efectiva solo ante la presencia de insulina, y tiene un efecto mayor al incrementar la acción de la misma. No se reconoce realmente como la metformina incrementa la acción de la insulina. Los efectos posreceptor incluyen supresión de la producción hepática de insulina (músculo e hígado) particularmente después de los alimentos, y además tiene un efecto antilipolítico al disminuir las concentraciones de ácidos grasos libres, reduciendo la disponibilidad de sustrato para gluconeogénesis.

### *Tiazolidinedionas*

Las tiazolidinedionas o glitazonas, dentro de las que destacan la rosiglitazona y la pioglitazona, son un grupo de sensibilizadores de insulina, considerados los primeros agentes orientados a resolver la causa principal de DM tipo 2, la resistencia a la insulina, por lo que se visualizan como uno de los más importantes avances terapéuticos de la enfermedad.

Las tiazolidinedionas o glitazonas actúan a nivel del núcleo celular de adipositos y músculo estriado, al estimular a los receptores llamados PPAR y potenciar la transcripción de los genes que son activados por la insulina.<sup>2</sup>

## MEDICINA TRADICIONAL

A pesar de la gran cantidad de alternativas en el tratamiento farmacológico, en México existe un gran apego hacia el tratamiento de diversas enfermedades con medicina tradicional, es decir una gran parte de la población recurre a tratamientos con plantas.

Por muchos años en México se han usado las plantas para tratar empíricamente la diabetes. La información etnobotánica mundial reporta al menos 800 plantas usadas en el control de la diabetes mellitus.

Aproximadamente 150 de estas existen en México, sin embargo solamente un pequeño número de ellas se han estudiado ( ver tabla 2 ), las plantas que más extensivamente han sido estudiadas en México son el “nopal” *Opuntia streptacantha* y la “tronadora” *Tezoma stans*, sin embargo actualmente se sabe de la existencia de otras 33 plantas antidiabéticas de origen Mexicano que también han sido probadas.<sup>22</sup>



Tabla 2

## PLANTAS UTILIZADAS EN MÉXICO PARA TRATAR LA DIABETES

Nombre científico	Familia	Nombre popular	Partes utilizadas	Preparación
<i>A. mexicana Willd</i>	Leguminosae	Estafate	Planta completa	Infusión
<i>A. viminalis HBK</i>	Bignoniaceae	Azuchil	Hojas	Infusión
<i>B pilosa L</i>	Compositae	Aceitilla	Planta completa	Infusión
<i>C. aurantium L</i>	Rutaceae	Naranja agria	Fruta fresca	Jugo
<i>C. multilobus (Lx.) L.M</i>	Euphorbiaceae	Chaya	Hojas	Infusión
<i>E. preslii</i>	Euphorbiaceae	Golondrina	Planta completa	Infusión
<i>E. pristata Ait</i>	Euphorbiaceae	Golondrina	Planta completa	Infusión
<i>E. caribaeum (Jacq.) Roem. &amp; Schult</i>	Rubiaceae	Quina	Corteza	Infusión
<i>E. polystachia (Ort.) S</i>	Leguminosae	Palo dulce	Tallo	Infusión
<i>G. ulmifolia Lam.</i>	Sterculiaceae	Guacima	Hojas	Infusión
<i>J. dioica Sessé ex Cern</i>	Euphorbiaceae	Sangre grado	Raíz	Infusión
<i>L. caulescens(Ort.) Epl</i>	Labiatae	Salvia	Flores	Infusión
<i>M.indica L.</i>	Anacardiceae	Mango	Hojas	Infusión
<i>M. piperita L.</i>	Labiatae	Hierbabuena	Planta completa	Infusión
<i>M. sapientum L.</i>	Musaceae	Platano	Flores frescas	Infusión
<i>O. europea L.</i>	Oleaceae	Olivo	Hojas	Infusión
<i>O.ficus- indica L.</i>	Cactaceae	Nopal	Penca fresca	Jugo
<i>P. edulis D.C.</i>	Bignoniaceae	Chote	Fruto fresco	Jugo
<i>P. americana(L.) Mill.</i>	Lauraceae	Aguacate	Semilla	Infusión
<i>R. echinocarpa Moc. Et Sess</i>	Rubiaceae	Granjel	Fruto	Infusión
<i>R. tetraphylla L.</i>	Apocynaceae	Paulillo	Hojas	Infusión
<i>R. mangle L.</i>	Rizophoraceae	Mangle rojo	Tallo	Infusión
<i>S. macrodonthus stand.</i>	Nyctaginaceae	Apatzicua	Raíz	Infusión
<i>S. skinneri Benth.</i>	Leguminosae	Paracata	Hojas	Infusión
<i>S. triquetra Radlk</i>	Sapindaceae	Palo de tres costillas	Tallo	Infusión
<i>T. foenum-graceum L.</i>	Leguminosae	Fenogreco	Semilla	Infusión
<i>T. hirsutissima L.</i>	Boraginaceae	Lagrimas de san Pedro	Tallo	Infusión
<i>T. difusa willd</i>	Turneraceae	Damiana	Hojas	Infusión



En la tabla 2 se han enlistado 28 plantas que se utilizan para el control de la diabetes mellitus en México, las cuales han sido probadas en modelos experimentales establecidos y 8 de estas han presentado actividad hipoglucemiante tal es el caso de la guacima, lágrimas de san pedro, salvia, mangle rojo, flores frescas de platano, fenogreco y la damiana, sin embargo no se ha evaluado su toxicidad, por lo tanto no es factible su uso clínico.<sup>25, 29</sup>

Así como las 28 plantas mostradas, se han registrado gran cantidad de plantas para el tratamiento empírico de la diabetes mellitus; no obstante, existen otras de las cuales no se tiene registro alguno de su uso como hipoglucemiante, tal es el caso de la *Colubrina elliptica*.<sup>30</sup>

### III.11 FAMILIA RHAMNACEAE

La familia comprende unos 44 géneros y alrededor de 850 especies, presentándose tanto en regiones templadas como tropicales de ambos hemisferios. Se conocen 11 géneros para México. Desde el punto de vista económico algunas ramnáceas son importantes por su valor ornamental, índole industrial y medicinal.<sup>3, 30</sup>

#### *Colubrina elliptica*

○ **Descripción botánica:** Arbusto o árbol de 2 a 6 m de alto con el tronco de hasta 1.2 m de diámetro; ramas delgadas, internodos de 3 a 60 mm de longitud, caedizas, peciolos de 5 a 25 mm de longitud, de 0.5 a 1 mm de grosor, láminas ovado-elípticas, ovadas a raramente casi lanceoladas, de 2.5 a 9 cm de longitud y 1.5 a 4.3 cm de ancho, ápice agudo a acuminado, raramente redondeado, base redondeada o ampliamente cuneada, margen entero pero en cada lado 1 a 10 mm de la base con una glándula marginal, inervación pinnada con 5 a 9 venas secundarias, haz glabro, envés con una pubescencia muy fina o glabrado; inflorescencias a manera de tirso con 8 a 20 flores, de 10 a 15 mm de longitud, pedúnculos de 1 a 7 mm de longitud, pedicelos de 2 a 4 mm de longitud, alargándose en los frutos hasta 8 a 15 mm de longitud; sépalos reflexos en la antesis; estilo trifido; fruto de 6 a 7 mm de longitud, casi esférico o ligeramente oblató, la



cúpula cerca de un cuarto o un tercio de su longitud, ligeramente tricoco, pardo o pardo-rojizo, pronto dehiscente; semillas de 4 a 5 mm de longitud, de 2.8 a 4 mm de ancho, obovadas, café oscuras, lustrosas, pared más bien delgada, cotiledones y endospermo casi del mismo espesor.

○ **Distribución geográfica:** Se localiza en Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Oaxaca, Chiapas, Yucatán; Centroamérica; Sudamérica y las antillas



Forma parte de algunos matorrales xerófilos y del bosque tropical caducifolio, donde suele habitar sobre empinadas laderas de cerros que a menudo son calizos. Alt. 250-2100 m. Florece de Junio a agosto. La madera es de color amarillo, pesada y muy fuerte; las hojas y la madera se ponen en agua para producir un colorante amarillo; el árbol es usado en Yucatán como remedio contra la sarna, y en regiones bien localizadas al sur de Tamaulipas y norte de Veracruz se utiliza para el control de la diabetes.<sup>5</sup>

Se realizaron estudios piloto que revelan que la concentración de glucosa normal en ratas Wistar es de  $88.4 \pm 13.1$  mg/dL, lo que concuerda con valores reportados por el método de la glucosa oxidasa ( $91 \pm 7$  mg/dL).<sup>41</sup> Asimismo, otras investigaciones demuestran que los niveles de glucosa disminuyeron a los 60 y 120 minutos, después de administrarles una infusión de la planta ( ver tabla 4, 5 y figura 2), además se observó que los niveles de alfa amilasa aumentan, de aquí la importancia de evaluar los niveles de esta enzima y de glucosa a estos tiempos.<sup>22,29,30</sup>

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mortalidad por diabetes ha demostrado un incremento sostenido durante las últimas décadas. Por ser una enfermedad incurable los diabéticos deben recibir tratamiento toda su vida y las repercusiones económicas al tratamiento y a sus complicaciones, representan una grave carga tanto para los servicios de salud como para los pacientes. Esto determina que una gran parte de ellos, en el transcurso del tiempo manifiesten una baja adherencia al tratamiento, lo que conduce a un deficiente control metabólico de la enfermedad, es por esto, que una considerable parte de la población durante mucho tiempo ha recurrido al control de la enfermedad con medicina tradicional.

Existe un número considerable de plantas que se utilizan para el control de la diabetes en México, sin embargo, las investigaciones realizadas al respecto son muy pocas. De ahí la importancia de evaluar la actividad hipoglucemiante de extractos obtenidos de *Colubrina elliptica* en un modelo de ratas hiperglicémicas con el propósito de aportar una alternativa más al tratamiento de esta enfermedad, así como también las bases necesarias para el aislamiento e identificación de las sustancias hipoglucemiantes activas que justifiquen su uso terapéutico.

#### V. OBJETIVOS

General:

- Evaluar el efecto hipoglucemiante de extractos obtenidos de *Colubrina elliptica* en un modelo de ratas hiperglicémicas.

Específicos

- Analizar el comportamiento de la glucemia con respecto al tiempo y dosis de extracto inoculado a 60 y 120 minutos.
- Evaluar la estimulación pancreática mediante la determinación de  $\alpha$ -amilasa. Evaluar el comportamiento de la glucemia con respecto al tiempo y dosis de infusiones inoculadas.



## VI. HIPÓTESIS

La diabetes mellitus es una enfermedad de tipo crónico degenerativo caracterizada por hiperglucemia que es controlable con plantas que muestran actividad hipoglucemiante, por lo que si a una población de ratas se les administra un extracto derivado de la planta con dicha actividad es de esperarse que los niveles de glucosa en sangre disminuyan.

## VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevo a cabo un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo de acuerdo a los siguientes criterios:

- Criterios de Inclusión: Ratas Wistar con peso de 220-450 g, sanas.
- Criterios de Exclusión: Ratas que presenten tumoraciones o lesiones.

Población de estudio: 140 Ratas Wistar hembras, que cumplan con los criterios de inclusión.

1. Se realizó un ensayo para verificar actividad hipoglucemiante de *Colubrina elliptica* contrastando con hipoglucemiantes conocidos (glibenclámda y tolbutamida) como controles positivos, y se utilizó agua en los animales que fueron controles negativos.
2. Se realizaron ensayos con diferente cantidad de corteza, tiempo de cocción y volumen administrado para ver un efecto dosis-respuesta.

## VIII. VARIABLES

- Dependiente: Hiperglucemia
- Independiente: Extracto y dosis.



## IX. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>MATERIAL BIOLÓGICO</b>	Especie: ratas Cepa: Wistar Peso: 220-450g Sexo: Hembras Cantidad: 140 (20 para cada ensayo)	<b>MARCA</b>
<b>MATERIAL DE VIDRIO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tubos de ensaye de 12 x 75</li><li>• Tubos de ensayede 13 X 100</li><li>• Vasos de precipitados de 50 mL, 250 mL y 500 mL.</li></ul>	Pirex
<b>EQUIPO</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Espectrofotómetro Lambda 1 UV/VIS</li><li>• Baño metabólico con sistema de circulación-253</li><li>• Vortex</li><li>• Centrífuga</li><li>• Balanza analítica de capacidad máxima 160 g</li><li>• Balanza granataria de capacidad – 2610g</li><li>• Balanza con canastilla de capacidad-2610g</li></ul>	Perkin Elmer Precision Genie Comercial cuvi Mettler H80 OHAUS OHAUS



<p><b>MATERIAL ESPECIAL</b></p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Micropipetas de volumen variable de capacidad: 10-100 <math>\mu</math> L 200-1000 <math>\mu</math> L</li><li>• Tubos ependorf</li><li>• Puntas para micropipetas</li><li>• Jeringas de 5 mL y de Insulina</li><li>• Tabla de disección</li><li>• Cronómetro</li><li>• Brinkmann Dispensette</li><li>• 4 jaulas para rata rotuladas del 1 al 4.</li><li>• Gasas</li><li>• Equipo comerciales para las determinaciones de glucosa y <math>\alpha</math>-amilasa.</li></ul> <p>-Glicemia enzimática Trinder Wiener Lab.</p> <p>-Método colorimétrico Caraway modificado en suero y orina Hycel de México.</p>	<p>Labnet Transferpette BRAND W-GERMANY</p> <p>Plastipak</p> <p>BRAND W-GERMANY</p>
---------------------------------	--	---



## X. ENSAYO BIOLÓGICO

El ensayo biológico se basó en un modelo de ratas hiperglicémicas, que consistió en volver hiperglicémicas a las ratas administrando glucosa al 50% por vía subcutánea a los cero y 60 minutos durante la curva de tolerancia.<sup>22</sup>

### Soluciones utilizadas en el ensayo biológico.

- Solución inyectable de glucosa al 50%.
- Solución del extracto a probar, que contenga 20 mg / mL.

### Ensayo biológico

1. Se tomó un grupo de 20 ratas y se dividió en 4 grupos con 5 elementos cada uno. Se marcaron del 1 al 5, se pesaron y fueron colocadas en las jaulas perfectamente rotuladas de modo que:
  - Grupo 1= testigos.
  - Grupo 2= Dosis de 20 mg / kg de peso.
  - Grupo 3= Dosis de 40 mg / Kg de peso.
  - Grupo 4= Dosis de 80 mg / Kg de peso.
2. Se realizaron cálculos necesarios para administrar las dosis de extracto especificadas para cada grupo así como para administrar una dosis de glucosa de 2 g / Kg de peso a toda la población a partir de una solución disponible (solución inyectable de glucosa al 50%).
3. Para iniciar la prueba de tolerancia a la glucosa, las ratas se sometieron a un ayuno mínimo de 18 horas.
4. Se les administró por vía subcutánea una dosis de glucosa de 2 g / Kg de peso a tiempo cero a los 4 grupos.
5. Inmediatamente después, se les administró por sonda gástrica el extracto (al grupo control se le administró agua) tomando en cuenta las dosis especificadas.
6. Transcurridos 60 minutos de la primera administración de glucosa, se sangraron por incisión de la parte distal de la cola y se recolectaron las muestras en tubos Eppendorf y se administró una segunda dosis de glucosa.
7. Transcurridos 60 minutos de la segunda administración de glucosa, se sangraron nuevamente y se recolectaron las muestras en tubos Eppendorf, de tal forma que se obtuvieron muestras de los 4 grupos a los 60 y 120 minutos.
8. Se separaron los sueros por centrifugación a 4500 r.p.m. durante 10 minutos.
9. Se determinó la concentración de glucosa por la técnica de glucosa oxidasa y la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa por el método colorimétrico Caraway modificado en los sueros obtenidos.

\*Nota: Por cada extracto probado se siguieron uno a uno los mismos pasos.



## XI. TÉCNICAS

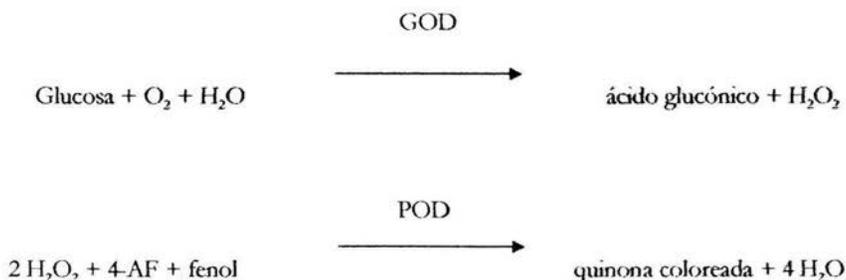
### XI.1 Determinación de glucosa

MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO O PLASMA (GOD-PAP) WIENER LAB.

El método a utilizado para la determinación de glucosa es enzimático; dicho método es comercial por lo que deben de seguirse al pie de la letra el procedimiento especificado y tomar en cuenta las notas aclaratorias; considerando que en el procedimiento las cantidades están modificadas para aplicar el micrométodo.

#### Fundamento y reacción

La glucosa oxidasa oxida a la glucosa según la reacción:



#### Reactivos:

Standard: Solución de glucosa 1 g / L.

GOD/POD: Solución de glucosa oxidasa (1000 U / mL) y peroxidasa (120 U / mL)

Reactivo 4-AF: Solución de 4-aminofenazona 25 mmol / L en Buffer Tris 0.92 mol/L.

Reactivo fenol: Solución de fenol 55 mmol / L.

#### INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: Listo para usar.

GOD/POD: Homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo 4-AF: Listo para usar.

Reactivo Fenol: Listo para usar

Reactivo de trabajo: De acuerdo al volumen de trabajo, colocar en una probeta 500 partes de agua destilada, 50 partes de reactivo 4-AF, 50 partes de reactivo Fenol y llevar a 1000 partes con agua destilada. Agregar 3 partes de GOD / POD previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.



**Material Biológico:** Suero

**PROCEDIMIENTO**

En tres tubos de ensayo marcados B(Blanco) S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	Blanco	Standard	Desconocido
<b>Standard</b>	-	10µL	-
<b>Muestra</b>	-	-	10µL
<b>Reactivo de trabajo</b>	1 mL	1 mL	1 mL

Incubar 10 minutos en baño de agua a 37° C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm llevando el aparato a cero con el blanco.

**Estabilidad de la mezcla de reacción final**

El color de reacción final es estable 1 hora, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

**Cálculo de los resultados**

Glucosa g / L = D X f

donde  $f = (1.00g/L) / S$



## XI.2 Determinación de $\alpha$ -amilasa

DETERMINACIÓN DE  $\alpha$ -AMILASA POR EL MÉTODO COLORIMÉTRICO, CARAWAY MODIFICADO EN SUERO Y ORINA. HYCEL DE MÉXICO.

El equipo utilizado para la determinación es comercial, por lo que se deben seguir al pie de la letra el procedimiento especificado y tomar en cuenta si existen notas aclaratorias considerando que en el procedimiento las cantidades están modificadas para aplicar el micrométodo.

### Fundamento

El método se basa en la modificación de Caraway, en el cual se mide la hidrólisis de un sustrato de almidón por la  $\alpha$ -amilasa del suero, en condiciones estandarizadas, formando un complejo colorido (azul-verde), cuya intensidad es proporcional a la concentración de amilasa presente en la muestra.

### Reactivos

-Sustrato de almidón pH 7.0

-Solución de Yodo N / 100

\*Los reactivos se utilizan directamente.

### Procedimiento

1. Marcar dos tubos de ensaye de 13 X 100 mL, uno para el problema y otro para el blanco.
2. Pipetear exactamente 500  $\mu$ L de sustrato de almidón en cada tubo.
3. Incubar el tubo marcado como problema a 37° C en un baño metabólico durante 5 minutos.
4. Transcurridos los 5 minutos pipetear exactamente 10  $\mu$ L de suero al tubo marcado como problema, mezclar bien y regresarlo al baño metabólico a 37° C durante 7.5 minutos exactamente.
5. Transcurridos los 7.5 minutos añadir 500  $\mu$ L de la solución de yodo N / 100 a los tubos problema y blanco, inmediatamente después añadir 4 mL de agua destilada.
6. Leer de inmediato la absorbancia del problema y el blanco a 660 nm estableciendo el cero de absorbancia con agua destilada.

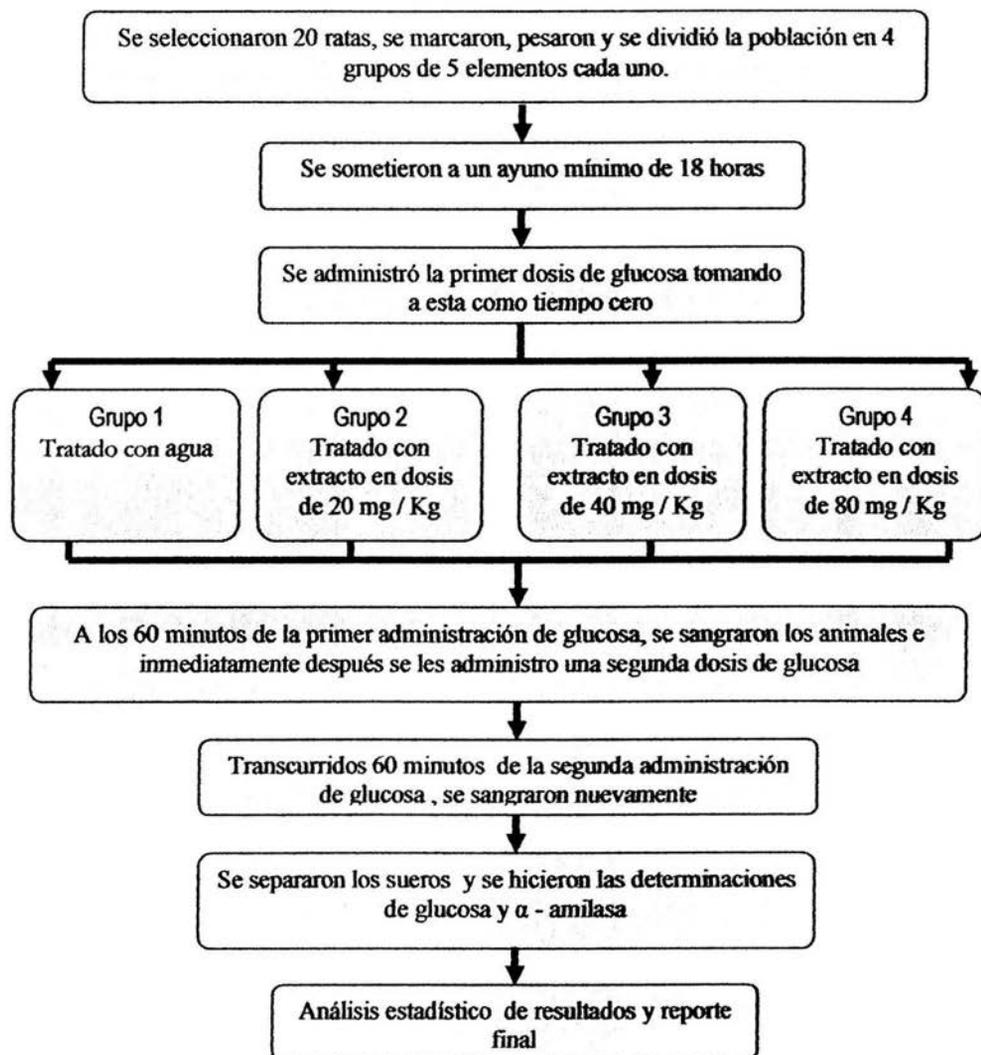
### Cálculos

$$\text{U. A. / 100 mL} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 800$$

\*U. A.= Unidades de amilasa.



### DIAGRAMA DE FLUJO





## XII. RESULTADOS

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron tratados estadísticamente mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 10 para Windows.

La significancia de las diferencias entre las medias de los grupos estudiados fue establecida por un análisis de varianza (ANOVA) manejando una confianza de 95% y  $\alpha=0.05$ .

Tabla 3

Tabla que muestra los ensayos realizados en forma general

EXTRACTOS PROBADOS	DOSIS (mg / Kg de peso de la rata)
Etanólico n = 20	20, 40 y 80
Metanólico n = 20	20, 40 y 80
Aguas madres del extracto etanólico n = 20	20, 40 y 80
Los ensayos anteriores no mostraron una disminución significativa en la glicemia, por lo que se procedió a aumentar las dosis de extracto etanólico, partiendo de 80 mg / Kg de peso.	
Etanólico n = 20	80, 160 y 320
Al aumentar la dosis del extracto etanólico no se observó una disminución significativa en la glicemia por lo que se procedió a probar la planta como tal para poder emitir una conclusión, variando la cantidad de corteza, volumen de agua y tiempo de cocción.	
28 gramos de corteza en 50 mL de agua hervidos por 1 minuto. n = 20	Volumen administrado: 0.25 mL, 0.5 mL y 1.0 mL.
28 gramos de corteza en 100 mL de agua hervidos por 10 minutos. n = 20	Volumen administrado: 0.25 mL, 0.5 mL y 1.0 mL.
14 gramos de corteza en 50 mL de agua hervidos por 1 minuto. n = 20	Volumen administrado: 0.25 mL, 0.5 mL y 1.0 mL.



## TABLAS DE RESULTADOS

Las diferencias entre los grupos se denotan como sigue:

- \* Grupos significativamente diferentes al grupo control.
- Grupos significativamente diferentes entre sí.
- Grupos significativamente diferentes entre sí.

Considerando un valor de  $P < 0.05$

Los resultados de glucosa están dados en mg / dL

Los resultados de amilasa están dados en Unidades de amilasa / 100 mL

Los siguientes resultados corresponden a un estudio piloto realizado que sustenta el objetivo del presente proyecto, ya que justifica la separación de la planta y la evaluación de los diferentes extractos obtenidos, el ensayo fue realizado de acuerdo a un modelo de ratas hiperglicémicas, donde se comparó la planta en estudio con dos hipoglucemiantes comerciales como controles positivos. La infusión se preparó a partir de 14 g de corteza en 50 mL de agua y se hirvió por 1 minuto. El volumen administrado fue de 0.5 mL.

Los datos de este ensayo mostrados en la tabla 4 y figura 2 son el resultado de dos ensayos realizados con un intervalo de 15 días, con una  $n=79 \pm$  S.E.M.

Tabla 4. Concentración de glucosa de infusión (14 g de corteza en 50 mL de agua y hervida por 1 minuto) comparada con tolbutamida y glibenclamida (como controles positivos) y con un grupo control.

GRUPO	t = 0	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Control n = 20	57 ± 3.8	152 ± 8.2	149 ± 3.6	120 ± 8.3	111 ± 5.3	94 ± 3.3
Tolbutamida n = 19	60 ± 3.3	135 ± 8.2	130 ± 4.7*	96 ± 2.7*	77 ± 3.8*	66 ± 3.9*
Glibenclamida n = 20	49 ± 4.0	119 ± 3.0*	125 ± 1.1*	95 ± 4.9*	68 ± 7.7*	50 ± 6.0*
Infusión n = 20	59 ± 1.6	121 ± 1.7*	128 ± 4.6*	124 ± 2.1	105 ± 2.8	105 ± 3.1

\* $P < 0.05$ . Grupo significativamente diferente al grupo control.

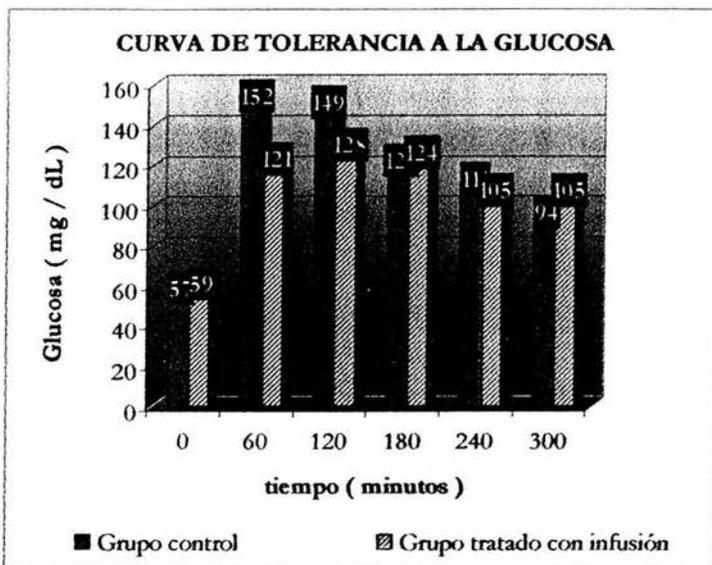


Figura 2. Curva de tolerancia a la glucosa de infusión comparada con el grupo control en donde se muestran diferencias significativas entre ambos grupos a los 60 y 120 minutos.

En este estudio piloto, también se evaluó la actividad de la alfa amilasa, los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de alfa amilasa de infusión (14 g de corteza en 50 mL de agua y hervida por 1 minuto) comparada con glibenclamida y tolbutamida como controles positivos y con un grupo control.

GRUPO	t = 0	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Control n = 20	587 ± 15.3	614 ± 8.1	591 ± 13.5	629 ± 12.7	620 ± 12.1	662 ± 9.6
Tolbutamida n = 19	572 ± 14.1	621 ± 12.1	635 ± 8.4	647 ± 11.8	645 ± 8.8	659 ± 7.4
Glibenclamida n = 20	573 ± 13.4	605 ± 12.9	600 ± 19.7	639 ± 15.4	646 ± 12.1	659 ± 9.2
Infusión n = 20	589 ± 9.9	612 ± 7.9	633 ± 11.4	622 ± 13.7	635 ± 11.6	647 ± 15.1

La concentración de alfa amilasa no se modificó.

Estos resultados demostraron que la planta tiene actividad hipoglucemiante, que se hace visible a los 60 y 120 minutos. Tomando como base los tiempos del estudio anterior, se procedió a evaluar los extractos. El primero de ellos fue el etanólico del cual se obtuvieron los siguientes resultados.



## EXTRACTO ETANÓLICO

Tabla 6. Concentración de glucosa en donde los grupos tratados con extracto etanólico son comparados entre si y con un grupo control con  $n=20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 minutos	120 min
Control	164 $\pm$ 29.2	187 $\pm$ 32
20 mg/ Kg	167 $\pm$ 28.8	194 $\pm$ 39.8
40 mg/ Kg	149 $\pm$ 24.8	202 $\pm$ 29.9
80 mg/ Kg	158 $\pm$ 14.4	192 $\pm$ 17.4

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 7. Concentración de alfa amilasa en donde los grupos tratados con extracto etanólico son comparados entre si y con un grupo control con  $n=20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min
Control	590 $\pm$ 32.2	656 $\pm$ 10.8
20 mg/ Kg	* 645 $\pm$ 21.9	648 $\pm$ 19.4
40 mg/ Kg	* 650 $\pm$ 38.7	656 $\pm$ 23.1
80 mg/ Kg	629 $\pm$ 21.7	648 $\pm$ 21.4

\* $P<0.05$ . Grupo significativamente diferente al grupo control.

La concentración de la enzima aumento en los grupos tratados con 20 y 40 mg de extracto.

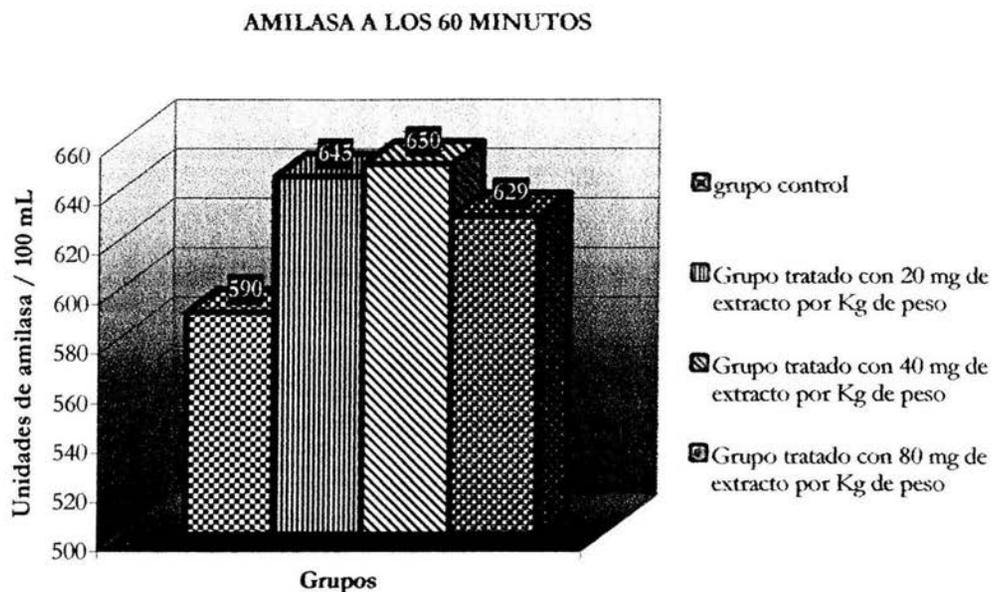


Figura 3. Gráfica que muestra la concentración de alfa amilasa a los 60 minutos, en donde los grupos tratados con 20 y 40 mg de extracto etanólico fueron significativamente diferentes al grupo control. La concentración de esta enzima aumentó en ambos casos.

No se observó una disminución en la glucemia, solamente un aumento en la concentración de alfa amilasa, por lo que se dio paso a evaluar el extracto metanólico.



## EXTRACTO METANÓLICO

Tabla 8. Concentración de glucosa. Grupos administrados con extracto metanólico son comparados entre si y con el grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min
Control	171 $\pm$ 17	186 $\pm$ 29
20 mg/ Kg	180 $\pm$ 38	187 $\pm$ 34.7
40 mg/ Kg	169 $\pm$ 27	189 $\pm$ 29.2
80 mg/ Kg	187 $\pm$ 41	201 $\pm$ 49

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 9. Concentración de alfa amilasa en donde grupos tratados con extracto metanólico son comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min
Control	600 $\pm$ 23.5	649 $\pm$ 10.0
20 mg/ Kg	* 673 $\pm$ 37.4	673 $\pm$ 30.5
40 mg/ Kg	665 $\pm$ 38.8	668 $\pm$ 40.5
80 mg/ Kg	649 $\pm$ 41.2	659 $\pm$ 33.6

\* $P < 0.05$ . Grupo significativamente diferente al grupo control.

El grupo tratado con 20 mg de extracto metanólico fue significativamente diferente al grupo control a los 60 minutos. La concentración de esta enzima aumento.



### AMILASA A LOS 60 MINUTOS

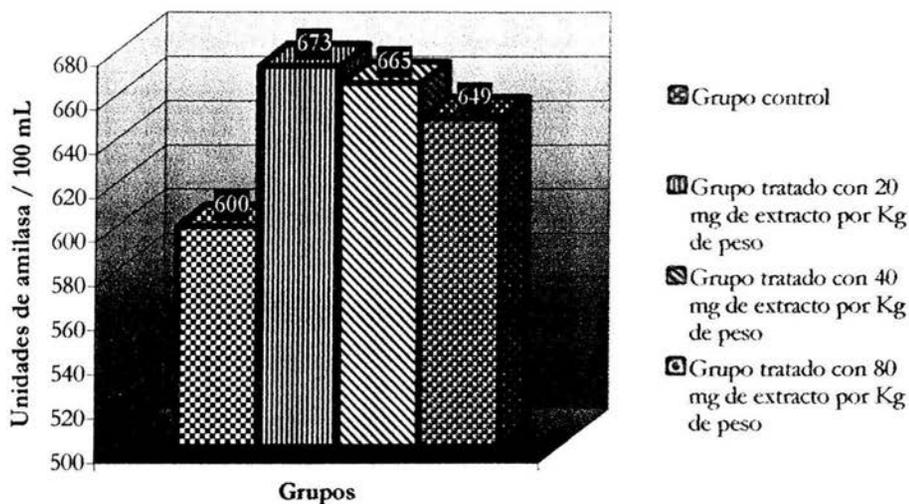


Figura 4. Gráfica que muestra la concentración de alfa amilasa a los 60 minutos, en donde el grupo tratado con 20 mg de extracto metanólico fue significativamente diferente al grupo control. La concentración de esta enzima aumentó.

Al evaluar el extracto metanólico el efecto hipoglucemiante no se observó, solamente se dio un aumento en la concentración de la alfa amilasa por lo que se decidió probar las aguas madres del extracto etanólico.



## AGUAS MADRES DE EXTRACTO ETANÓLICO

Tabla 10. Concentración de glucosa de grupos tratados con aguas madres del extracto etanólico comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min
Control	$143 \pm 24.3$	$191 \pm 25.0$
20 mg/ Kg	$*181 \pm 18.1$ ●	$216 \pm 20.4$ ●
40 mg/ Kg	$147 \pm 14.6$ ●	$164 \pm 19.6$ ●○
80 mg/ Kg	$159 \pm 7.5$	$200 \pm 9.3$ ○

●○\*P &lt; 0.05

La glucemia aumento en el grupo tratado con 20 mg de extracto por lo que resultó significativamente diferente al grupo tratado con 40 mg y al grupo control. Además a los 120 minutos la glucemia aumento en el grupo tratado con 80 mg de extracto y fue significativamente diferente al grupo tratado con 40 mg.

## GLICEMIA A LOS 60 MINUTOS

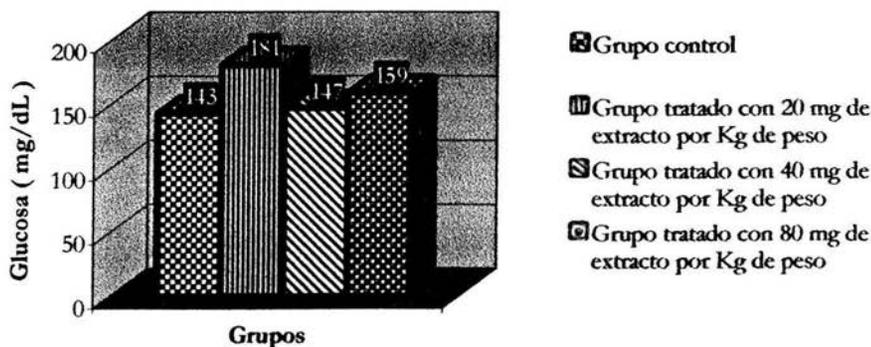


Figura 5. Gráfica que muestra el aumento de la glucemia en el grupo tratado con 20 mg de extracto por lo que es significativamente diferente al grupo control y al grupo tratado con 40 mg de extracto.

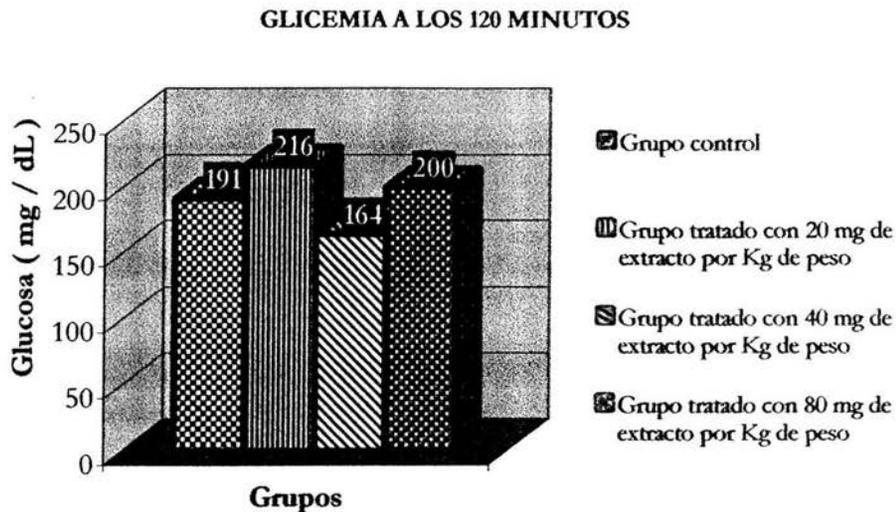


Figura 6. Gráfica que muestra el aumento de la glucemia en el grupo tratado con 20 mg de extracto por lo que es significativamente diferente al grupo tratado con 40 mg de extracto. Además se observa un aumento de la glucemia en el grupo tratado con 80 mg por lo que es significativamente diferente al grupo tratado con 40 mg del extracto.

Tabla 11. Concentración de alfa amilasa en donde grupos tratados con aguas madres del extracto etanólico son comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm S.D.$ 

GRUPO	60 min	120 min
Control	682 $\pm$ 20.1	681 $\pm$ 14.9
20 mg/ Kg	668 $\pm$ 42.8●	674 $\pm$ 47.7
40 mg/ Kg	* 603 $\pm$ 34.2	* 602 $\pm$ 47.0
80 mg/ Kg	* 582 $\pm$ 43.8●	* 597 $\pm$ 52.5

●○\*P &lt; 0.05

La concentración de la enzima disminuyó en los grupos tratados con 40 y 80 mg del extracto a los 60 y 120 minutos resultando estos significativamente diferentes al grupo control. Además el grupo tratado con 20 mg fue significativamente diferente al grupo tratado con 80 mg de extracto, ya que disminuyó la concentración de la enzima al aumentar la dosis.

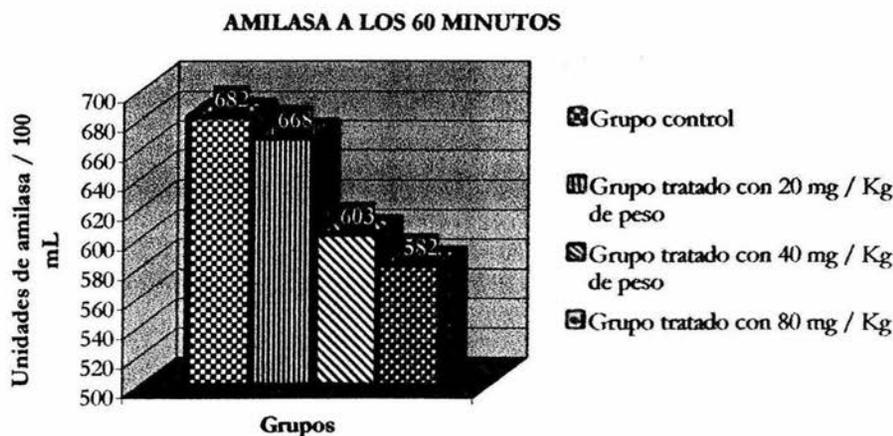


Figura 7. Gráfica que muestra la disminución de la concentración de alfa amilasa en los grupos tratados con 40 y 80 mg de extracto por lo que son significativamente diferentes al grupo control. La concentración de la enzima disminuye al aumentar la dosis, por lo que el grupo tratado con 20 mg de extracto es significativamente diferente al grupo tratado con 80 mg.

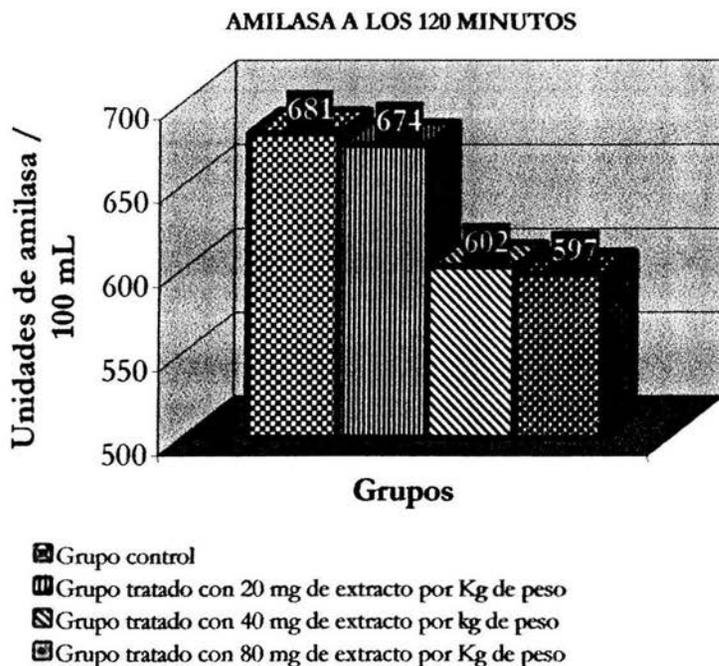


Figura 8. Gráfica que muestra la disminución de la concentración de alfa amilasa en los grupos tratados con 40 y 80 mg de extracto por lo que son significativamente diferentes al grupo control.

Los resultados obtenidos al probar las aguas madres mostraron que la concentración de la alfa amilasa disminuyó conforme se aumentó la dosis de extracto y la glucemia en lugar de disminuir aumento, por lo que se decidió probar el extracto etanólico en dosis superiores en una curva de tolerancia completa.

**EXTRACTO EN DOSIS DE 80, 160 Y 320 mg / Kg DE PESO**Tabla 12. Concentración de glucosa de grupos tratados con extracto etanólico comparados entre sí y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Control	186 $\pm$ 61	202 $\pm$ 41.4	169 $\pm$ 31.1	137 $\pm$ 36.6	127 $\pm$ 18.3
80 mg/ Kg	210 $\pm$ 24.6	247 $\pm$ 35.4 ●○	189 $\pm$ 31.4	135 $\pm$ 22.2	135 $\pm$ 15.1
160 mg/ Kg	157 $\pm$ 21.9	184 $\pm$ 21.1 ●	164 $\pm$ 11.4	144 $\pm$ 18.3	136 $\pm$ 24.5
320 mg/ Kg	156 $\pm$ 25.1	178 $\pm$ 35.3 ○	166 $\pm$ 24.0	145 $\pm$ 17.8	154 $\pm$ 23.0

●○P &lt; 0.05

Se encontraron diferencias entre el grupo tratado con 80 mg de extracto (en donde la glucemia aumento) con los grupos tratados con 160 y 320 mg.

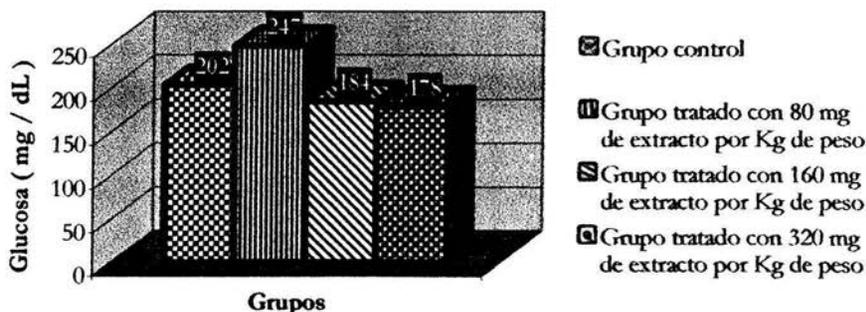
**GLICEMIA A LOS 120 MINUTOS**

Figura 9. Gráfica que muestra el aumento de la glucemia en el grupo tratado con 80 mg de extracto, por lo que es significativamente diferente a los grupos tratados con 160 y 320 mg



Tabla 13. Concentración de alfa amilasa de grupos administrados con extracto etanólico comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm S.D.$

GRUPO	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Control	632 $\pm$ 59.1	648 $\pm$ 45	651 $\pm$ 52.4	680 $\pm$ 43.5	659 $\pm$ 42
80 mg/ Kg	617 $\pm$ 35.6	633 $\pm$ 33.4	654 $\pm$ 36.4	684 $\pm$ 17.6	675 $\pm$ 17.6
160 mg/ Kg	608 $\pm$ 50.1	628 $\pm$ 42.3	644 $\pm$ 39.6	651 $\pm$ 35.8	644 $\pm$ 22.2
320 mg/ Kg	633 $\pm$ 25.8	637 $\pm$ 25.8	659 $\pm$ 27.9	669 $\pm$ 24.1	656 $\pm$ 28.9

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Como se puede ver con anterioridad, probar el extracto etanólico en dosis superiores tampoco nos proporcionó resultados que justificaran la actividad de la planta, por lo que se procedió a evaluar la planta como infusión, arrojando los siguientes resultados.



### INFUSIÓN (28 g de corteza en 50 mL de agua hervidos por 1 minuto)

Tabla 14. Concentración de glucosa de grupos tratados con infusión comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D. No se dieron diferencias significativas entre los grupos.

GRUPO	t = 0	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Control	79 $\pm$ 11.3	139 $\pm$ 21.6	193 $\pm$ 21.9	163 $\pm$ 22.8	162 $\pm$ 26	149 $\pm$ 22.7
0.25 mL	88 $\pm$ 14.1	166 $\pm$ 27	224 $\pm$ 35.4	172 $\pm$ 16.9	167 $\pm$ 20.7	146 $\pm$ 7.7
0.5 mL	91 $\pm$ 10.8	170 $\pm$ 36	183 $\pm$ 34.8	148 $\pm$ 21.1	142 $\pm$ 19.7	141 $\pm$ 17.7
1.0 mL	96 $\pm$ 21.8	196 $\pm$ 34.5	237 $\pm$ 27.7	179 $\pm$ 19	169 $\pm$ 24.9	157 $\pm$ 16.6

Tabla 15. Concentración de alfa amilasa de grupos tratados con infusión comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	t = 0	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Control	520 $\pm$ 74.3	569 $\pm$ 48.3	592 $\pm$ 40	555 $\pm$ 41.7	562 $\pm$ 57.4	665 $\pm$ 26.2
0.25 mL	542 $\pm$ 55.8	588 $\pm$ 27.2	618 $\pm$ 36.4	581 $\pm$ 29.5	590 $\pm$ 22.5	647 $\pm$ 42.7
0.5 mL	611 $\pm$ 15.4	* 638 $\pm$ 21.1	628 $\pm$ 35.8	*625 $\pm$ 18.8	621 $\pm$ 30.9	680 $\pm$ 23.6
1.0 mL	536 $\pm$ 33.6	582 $\pm$ 38.1	594 $\pm$ 40.0	598 $\pm$ 28.2	591 $\pm$ 29.0	653 $\pm$ 25.9

\*P<0.05

La concentración de esta enzima aumento a los 60 y 180 minutos, resultando significativamente mayor al grupo control en los grupos tratados con 0.5 mL de infusión.

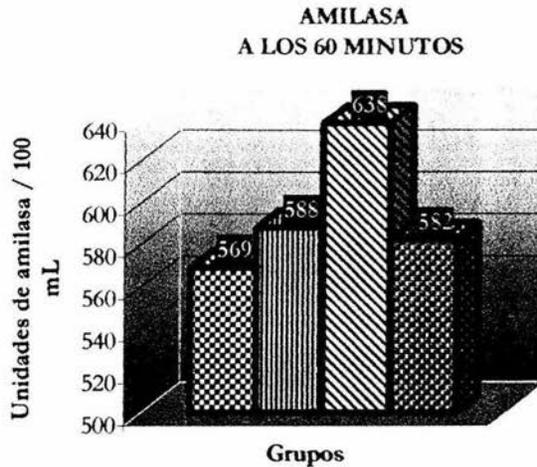


Figura 10. Gráfica que muestra el aumento en la concentración de alfa amilasa en el grupo tratado con 0.5 mL de infusión respecto al grupo control.

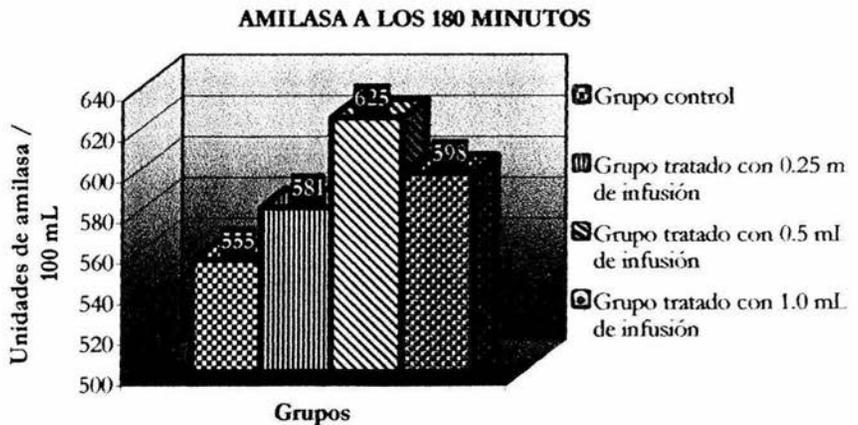


Figura 11. Gráfica que muestra el aumento en la concentración de alfa amilasa en el grupo tratado con 0.5 mL de infusión respecto al grupo control.

No se observaron cambios en la glucemia por lo que se decidió modificar el volumen de agua y el tiempo de cocción, evaluando la infusión a los 60, 120 y 180 minutos.



## INFUSIÓN

( 28 g de corteza en 100 mL de agua hervida por 10 minutos)

Tabla 16. Concentración de glucosa de grupos tratados con infusión comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min	180 min
Control	143 $\pm$ 14.9	167 $\pm$ 7.0	162 $\pm$ 13.7
0.25 mL	158 $\pm$ 4.3	185 $\pm$ 23.9	153 $\pm$ 6.1
0.5 mL	159 $\pm$ 15.0	170 $\pm$ 25.7	158 $\pm$ 32.5
1.0 mL	161 $\pm$ 11.2	157 $\pm$ 10.0	135 $\pm$ 9.4

No se dieron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 17. Concentración de alfa amilasa de grupos tratados con infusión comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min	180 min
Control	619 $\pm$ 53.2	654 $\pm$ 35.9	670 $\pm$ 40.2
0.25 mL	644 $\pm$ 15.4	667 $\pm$ 9.7	685 $\pm$ 11.8●
0.5 mL	622 $\pm$ 18.9	630 $\pm$ 29.8	654 $\pm$ 24.4
1.0 mL	590 $\pm$ 22.7	621 $\pm$ 20.5	624 $\pm$ 32.5●

● $P < 0.05$

Se dieron diferencias significativas entre los grupos tratados con 0.25 mL y 1 mL de infusión a los 180 minutos. La concentración de esta enzima se modifico al aumentar el volumen de infusión administrado.



### AMILASA A LOS 180 MINUTOS

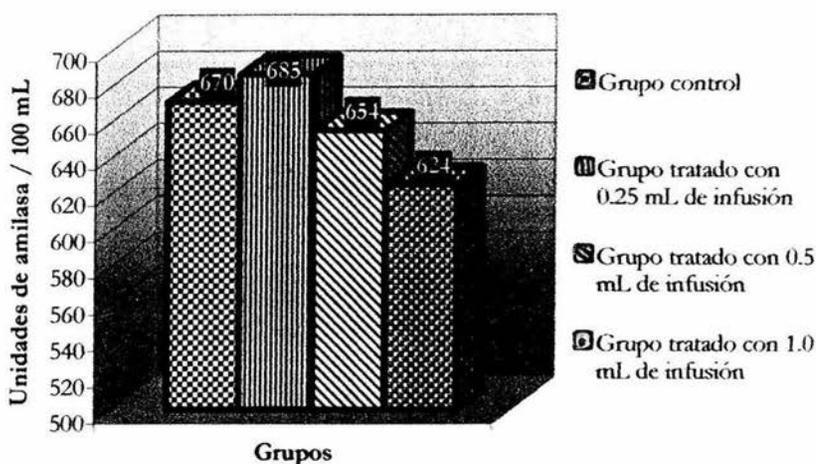


Figura 12. Gráfica que muestra diferencia significativa entre el grupo tratado con 0.25 mL de infusión y el tratado con 1 mL.

Las modificaciones en cuanto a cantidad de corteza y tiempo de cocción no proporcionaron resultados concluyentes, por lo que decidimos probar la planta en igual forma que para el estudio piloto con el fin de emitir una conclusión respecto a la actividad de la planta.



## INFUSIÓN

(Preparada a partir de 14 g de corteza en 50 mL de agua y hervida por 1 minuto)

Tabla 18. Concentración de glucosa de grupos tratados con infusión comparados entre si y con un grupo control con  $n = 20 \pm$  S.D.

GRUPO	60 min	120 min	180 min
Control	204 $\pm$ 30.1	234 $\pm$ 47.2	205 $\pm$ 27.3
0.25 mL	185 $\pm$ 10.1	168 $\pm$ 88.3	*150 $\pm$ 19.4
0.5 mL	198 $\pm$ 24.4	215 $\pm$ 43.0	164 $\pm$ 33.3
1.0 mL	185 $\pm$ 70.8	193 $\pm$ 39.4	172 $\pm$ 14.9

\* $P < 0.05$

La glucemia del grupo tratado con 0.25 mL de infusión es significativamente menor al grupo control a los 180 minutos.

### GLICEMIA A LOS 180 MINUTOS

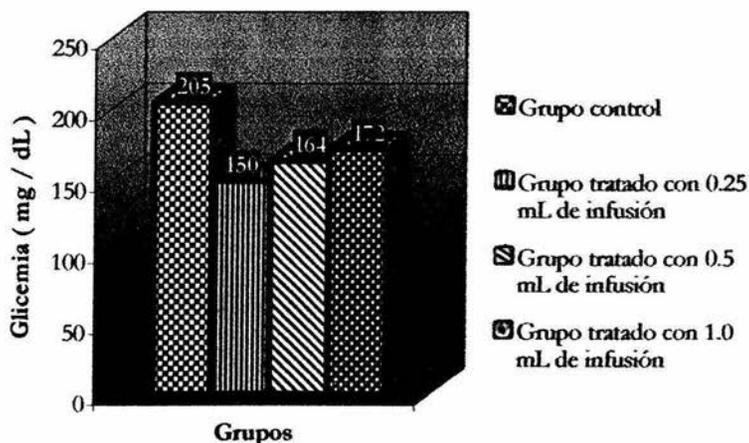


Figura 13. Gráfica que muestra la disminución de la glucemia en el grupo tratado con 0.25 mL de infusión (significativamente diferente al grupo control).



Tabla 19. Resultados de alfa amilasa en donde los grupos administrados con infusión son comparados entre si y con un grupo control (grupo tratado con agua). Se muestra el valor de la media  $\pm$  S.D..

GRUPO	60 min	120 min	180 min
Control	614 $\pm$ 32.9	636 $\pm$ 36.2	640 $\pm$ 31.1
0.25 mL	596 $\pm$ 10.7	613 $\pm$ 18.9	620 $\pm$ 15.7
0.5 mL	610 $\pm$ 26.8	637 $\pm$ 36.2	637 $\pm$ 31.0
1.0 mL	589 $\pm$ 29.3	610 $\pm$ 24	618 $\pm$ 40.8

No se dieron diferencias significativas entre los grupos

Los resultados demostraron la planta sí posee actividad hipoglucemiante, efecto que se hizo visible a los 180 minutos después de haber administrado 0.25 mL de infusión.



### XIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La diabetes mellitus es una enfermedad en la cual el mantener la concentración de glucosa dentro de los niveles adecuados, son condiciones necesarias para que el enfermo pueda tener una buena calidad de vida al retrasar o evitar las complicaciones concomitantes. Las plantas con actividad hipoglucemiante representan una alternativa más al tratamiento de esta enfermedad, y el estudio de estas nos proporcionan las bases necesarias para el aislamiento e identificación de las sustancias hipoglucemiantes activas que justifiquen su uso terapéutico.

Estudios piloto mostraron que la planta poseía actividad hipoglucemiante al realizarse un ensayo en el cual se comparó la infusión (preparada a partir de 14 g de corteza en 50 mL de agua hervida por 1 minuto) con dos hipoglucemiantes comerciales ( como controles positivos) y un grupo control negativo al cual se le administró agua. Los resultados de dicho estudio se muestran en las tablas 4, 5 y figura 2, en donde se observa que la glicemia disminuyó en forma significativa a los 60 y 120 minutos.

Estos estudios dieron pauta para que se realizara la separación de la planta en sus diferentes fracciones, de las cuales se probaron tres, el extracto etanólico, metanólico y las aguas madres del extracto etanólico.

Al realizar el ensayo biológico con los extractos etanólico, metanólico y aguas madres del extracto etanólico, los resultados revelaron que los niveles de glucosa no disminuyeron en forma significativa, incluso tendieron a elevarse, tal es el caso de las aguas madres (ver tabla 10 y figura 5 y 6), por lo que se procedió a probar el extracto etanólico en dosis mayores, los resultados nuevamente revelaron que la glicemia no disminuyó, incluso aumento en el grupo tratado con 80 mg del extracto ( ver tabla 12 y figura 9).

Los niveles de alfa amilasa se elevaron para los extractos etanólico y metanólico (ver tablas 7 y 9 y figuras 3 y 4), caso contrario para las aguas madres del extracto etanólico, en que los niveles de esta tendieron a disminuir (tabla 11 y figuras 7 y 8).

Con respecto al extracto etanólico en dosis aumentadas no se presentó algún aumento o disminución en la concentración de esta enzima.

Al no obtener resultados que sustentaran el objetivo del presente proyecto, se procedió a probar la planta como tal con el fin de emitir una conclusión respecto a su presunta actividad, para esto se realizaron diferentes ensayos modificando la cantidad de corteza utilizada, el volumen de agua, el tiempo de cocción, y se administro en diferentes volúmenes.

Cuando se realizaron los ensayos con las infusiones, se demostro que la planta sí posee actividad hipoglucemiante, al probar la infusión (preparada a partir de de 14 g de corteza en 50 mL de agua y hervida por 1 minuto), hubo una diferencia significativa entre el grupo tratado con 0.25 mL de infusión y el grupo control a los 180 minutos (tabla 18 y figura 13).



Al duplicar la cantidad de corteza (28g de corteza en 50 mL de agua hervida por 1 minuto), la glucemia no disminuyó y los niveles de alfa amilasa se elevaron (tablas 14 y 15, figuras 10 y 11). Cuando se modificó el tiempo de cocción (28g de corteza en 100 mL de agua por 10 minutos), los niveles de glucosa tampoco disminuyeron, únicamente se dio un aumento en la concentración de la alfa amilasa (tablas 16, 17 y figura 12), por lo que existe la posibilidad de que la actividad de la planta se haya perdido al prolongar el tiempo de ebullición.

Por los resultados obtenidos podemos decir que para determinados extractos, se observa que a ciertas dosis la tendencia de la glucemia en lugar de disminuir es aumentar, no se sabe que es lo que provoque este aumento tal vez se deba a la dosis utilizada para cada extracto en particular.

Sin embargo, es notable que los niveles de la alfa amilasa están elevados y no se descarta la posibilidad de que esta enzima juegue un papel importante en enmascarar el efecto de la planta ya que se trata de una enzima con capacidad de hidrolizar polímeros de glucosa como es el caso del glucógeno. Puede ser que la enzima rompa glucógeno de reserva y saque glucosa a la circulación y que por tanto no se observe el efecto esperado o que tal vez dicho efecto no esté presente debido al tratamiento que se le dio a la planta en su separación, o que en dado caso un grupo de sustancias destinadas a proporcionar el efecto, al ser separadas ya no lo proporcionen.

#### XIV. CONCLUSIONES

- La *Colubrina elliptica* sí presentó actividad hipoglucemiante, y dicha actividad es dependiente de el tratamiento que se da a la planta, así como también de la cantidad de corteza utilizada.
- No se observó evidencia de la actividad hipoglucemiante en los extractos probados.
- Los niveles de la alfa amilasa presentan una tendencia a elevarse y esta tendencia al parecer es dependiente de la dosis y del tipo de extracto.
- Es probable que la alfa amilasa juegue un papel importante en el enmascaramiento del efecto hipoglucemiante.
- La actividad hipoglucemiante puede estar dada por un grupo de sustancias destinadas a ese fin. La dosis, así como el tratamiento, son factores determinantes para que esta se presente.

#### XV. SUGERENCIAS

- Se recomienda evaluar los extractos en concentraciones mínimas.
- Probar los extractos derivados de la planta que son insolubles en agua.
- Hacer el ensayo con algún inhibidor de la alfa amilasa.



## XVI. BIBLIOGRAFIA

1. Islas S, Lifshitz A. Diabetes mellitus. 2ª Ed: México:Mc.Graw- Hill Interamericana. 1999. p. 41-55,63-66,71-77,139-157.
2. Alpízar M, González J. Guía para el manejo integral del paciente diabético. México: El manual moderno. 2001. p. 1-3, 5-11, 23-28, 127-135, 165-191, 61-63, 41-44.
3. Andreoli T, Carpenter c, Bennett J, Plum F. Compendio de medicina interna. 4ª Ed. México: Mc.Graw- Hill interamericana. 1999. p.523-535.
4. Anderson S, Cockayne S. Química clínica. México: Mc.Graw-Hill Interamericana. 1995. p.141-155.
5. Instituto de Ecología A.C. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Rafael Fernández Nava Fasc.43. 1996; p.1,2,15-17.
6. Secretaría de Salud. Programa de acción: Diabetes Mellitus. México: SSA. 2001; 10-11,15-27.
7. Walter J. Patología Humana. México:Mc. Graw-Hill Interamericana. 1994. p.355-361.
8. Chandrasoma P. Patología general. México: El Manual Moderno. 1994. p 725-735.
9. Hendrik H, Frederik J, Lehert P, Schouten J, Bets D. Combined Metformin and Insulin Therapy for Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Clinical Therapeutic 2000; 22: 709-716.
10. González J, Arilla E. Bioquímica clínica. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España. 1998. p 339-361.
11. Deska K, Mosby R. Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. España: División de Times Mirror de España. 1994 p 427-433.
12. White F, Nanam D, Situación de programas nacionales contra la Diabetes Mellitus en las Américas. Boletín de la OMS 1999; 77: 981-987.
13. Islas S, Lifshitz A. Diabetes Mellitus. México: Nueva Editorial Interamericana. 1993. p 8-11.
14. Figuerola D. Diabetes. 2ª Ed. Barcelona, España: Salvat. 1990. p 1-13.



15. Henry J. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9, Ed. Científicas y técnicas. 1991. p 179-185,573-576.
16. Bauer J. Análisis Clínicos: Métodos e interpretación. Barcelona, España: Reverté. 1986. p 517-529.
17. Modificación a la norma oficial mexicana NOM-015-SSA2-1994. Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes. Subsecretaría de prevención y control de enfermedades coordinación de vigilancia epidemiológica.
18. Subsecretaría de prevención y control de Enfermedades. Coordinación de vigilancia epidemiológica. Manual para el manejo de Insulinas. México: SSA. 2000; 2-13,43-50.
19. Cambranis W, Dorantes L, Coyote N. Avances en la prevención, automonitoreo, aplicación de insulina y tratamiento en la Diabetes Mellitus tipo 1. Boletín Médico del Hospital Infantil de México 2002; 59: 52-62.
20. Manual de procedimientos para la atención integral a derechohabientes con factores de riesgo asociados a Diabetes Mellitus o con Diabetes Mellitus. México: IMSS. 2000; 159-164, 180-191.
21. Gerich J. Matching Treatment to Pathophysiology in Type 2 Diabetes. Clinical Therapeutics 2001; 23:646-655.
22. Alarcón F, Ramos R, Pérez S, Aguilar A, Contreras C, Flores J. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics J Ethnopharmacology. 1998; 61: 101-110.
23. Atkinson M, Eisenbarth G. Type I diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet 2001; 358: 221-229.
24. Grill W, Björklund A. Dysfunctional insulin secretion in type 2 diabetes; role of metabolic abnormalities. CMLS. 2000; 57: 429-440.
25. Pesce Kaplan. Química Clínica: Teoría, Análisis y Correlación. Cincinnati, OH, USA. Pesce Kaplan Publishers, Inc. 2001.
26. [http://www.encolombia.com/cirugía14399\\_mellitus13.htm](http://www.encolombia.com/cirugía14399_mellitus13.htm)
27. Rivera A, Cruz M, Kumate J. La diabetes: Un problema de salud pública en el mundo. Una nueva perspectiva. Revista Especializada en Ciencias de la Salud. 2000; 3( 1 / 2 ) : 50-55.
28. Moreno L. Epidemiología y diabetes. Rev Fac Med UNAM 2001; 44: 35-37.



29. Aybar M, Sánchez A, Grau A, Sánchez S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* ( yacon ) leaves in normal and diabetic rats. *Ethnopharmacology*.2001; 74: 125-132.
30. Marroquín R, Sánchez O, Flores M, Mora J. Tratamiento de ratas hiperglucémicas con el extracto de la planta *Colubrina elíptica*. Procedente del XV congreso Internacional de Medicina Tradicional y Alternativas Terapéuticas; 2001 Nov 15-19, México. D.F.
31. Morrison T. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. México: Manual moderno. 1998. p19-22.
32. Pacheco. D. Biología aplicada a la medicina. México: IPN. 1996. p 205-206.
33. G. Katzung. Farmacología básica y clínica. 8ª. Ed: México: manual moderno. 2002. p 801-825
34. Farías G. Química clínica. 10 a. Ed.: México: Manual moderno. 1999. p 268-270.
35. Islas A. Diabetes mellitus. México: Interamericana Mc. Graw-Hill 1993. p 8-14.
36. Figuerola D. Diabetes. 2ª. Ed: España: Salvat Editores, S.A. 1990. p 1-4.
37. Tsujino K, Yoshimura M, UmeKi K, Minamiura N, Yamamoto T. A Glucose-forming Amylase in Human Liver. *J Biochemistry*. 1974; 76: 1235-1242.
38. Brosemer R, Rutter W. Liver Amylase. *J Biological Chemistry*. 1961; 236: 1253-1263.
39. Olavaria J, Torres H. Mechanism of Action of liver  $\alpha$ -Amylase. *J Biological Chemistry*. 1962; 237: 1746-1751.
40. Wilkinson J. Introducción al diagnóstico enzimático. España: Toray, S.A.1965. p 62-73.
41. Almagro B. Esquemas y prácticas de Farmacología. Barcelona: Espaxs. 1977.p 19-29.