



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

*EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO EN HEPATOCITOS  
PRODUCIDO POR EL COMPUESTO THELZÁN 101, ASÍ  
COMO SU CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE Y  
REGENERADORA DE CÉLULAS  $\beta$  PANCREÁTICAS EN UN  
MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS MACHO SANAS.*

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**MIGUEL ÁNGEL MORENO PATRÓN**

**Asesora:** Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.  
**Coasesores:** Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda.  
Dr. Carlos Gerardo García Tovar.



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.

## CONTENIDO DE LA TESIS

### ÍNDICE GENERAL

Índice General

1

Índice de Figuras

4

Índice de Tablas y Gráficas

8

Abreviaturas

9

Resumen

11

I. Introducción

13

Capítulo 1. La Fitoterapia 15

❖ Fitofármaco 15

○ Calidad, Seguridad 19

○ Eficacia 20

○ Thelzán 101

21

○ Apigenina y Flavonoides 22

○ Tecoma Stans 26

○ Vaccinium Myrtillus 29

Capítulo 2. Órganos involucrados en la hiperglicemia 31

❖ Hígado 31

❖ Páncreas 34

○ Páncreas Exocrino 37

○ Páncreas Endocrino 38

● Insulina 40

Capítulo 3. Diabetes Mellitus	47
❖ Causas	48
❖ Síntomas	50
❖ Complicaciones	51
❖ Diagnóstico	53
❖ Diabetes Mellitus Tipo 1	54
❖ Diabetes Mellitus Tipo 2	55
❖ Otros Tipos Específicos de Diabetes Mellitus	57
Capítulo 4. Tratamiento para la Diabetes Mellitus	58
❖ Tratamiento No Farmacológico	58
○ Dieta	58
○ Ejercicio físico	59
❖ Tratamiento Farmacológico	60
○ Hipoglucemiantes orales	60
• Sulfonilureas	61
• Biguanidas	63
• Inhibidores de las $\alpha$ -glucosidasas	64
• Tiazolidinedionas	65
○ Seguridad de los hipoglucemiantes orales	66
○ Insulina	66
• Tipos de insulina	67
• Control y complicaciones del tratamiento insulínico	67
❖ Otros Tipos de Terapia	68
○ Bombas de insulina	68
○ Transplantes	68
○ Incremento de la captación de glucosa	68
○ Terapia génica	69
○ Terapia celular	69
○ Regeneración de islotes	69
▪ Neogénesis de células $\beta$ pancreáticas	70
▪ Replicación de células $\beta$ pancreáticas	70
▪ Apoptosis y supervivencia de las células $\beta$ pancreáticas	71

III. Justificación	72
IV. Objetivos	75
❖ Objetivo general	75
❖ Objetivos particulares	75
V. Hipótesis	75
VI. Materiales y métodos	76
❖ Determinación de los niveles de glucosa en rata	76
❖ Evaluación farmacológica del efecto hipoglucemiante de Thelzán 101	77
❖ Estudio histopatológico y ultraestructural del hígado y páncreas	79
VII. Resultados	83
VIII. Discusión	100
IX. Conclusiones	111
X. Bibliografía	112

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1.- La calidad de los medicamentos a base de plantas medicinales

19

Fig.2.- Niveles de evidencia para el reconocimiento de eficacia de acuerdo con Agency for Health Care Policy and Research de EE.UU y la OMS

20

Fig.3.- Cromatografía de líquidos de alta resolución

21

Fig.4.- Espectrometría de masas

21

Fig.5.- Cristalografía

21

Fig.6.- Espectroscopia por Infrarrojo

21

Fig.7.- Estructura química de los flavonoides

22

Fig.8.- Derivados de los flavonoides

23

Fig.9.- Árbol, flor y tallo de la *Tecoma stans*

26

Fig.10.- Flor y fruto de la *Vaccinium myrtillus*

29

Fig11.- Estructura del hígado

31

Fig12.- Estructura del páncreas

34

Fig.13.- Distribución celular en el islote pancreático (de Langerhans) humano

38

Fig.14.- Ideograma del cromosoma 11

41

Fig.15.- Representación de los exones que codifican a la insulina

41

Fig.16.- Representación de la insulina humana

42

Fig.17.- Síntesis y secreción de la insulina

43

Fig.18.- Mecanismo de acción de la insulina sobre las células blanco y sus principales acciones biológicas

43

Fig.19.- Efectos de la deficiencia de insulina

46

Fig.20.- Algunas causas de la diabetes

49

Fig.21. Hígado teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).100X

90

Fig.22. Hígado teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).400X

90

Fig.23. Hígado teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).1000X

91

Fig.24. Páncreas teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A)

y tratados (B).100X

91

Fig.25. Páncreas teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A)  
y tratados (B).400X

92

Fig.26. Páncreas teñido con Azul de Toluidina de animales control (A)  
y tratados (B).100X

92

Fig.27. Islote pancreático teñido con Azul de Toluidina de animales control (A)  
y tratados (B).400X

93

Fig.28. Páncreas teñido con Aldehído Fucsina de animales control (A)  
y tratados (B).100X

93

Fig.29. Islote pancreático teñido con Aldehído Fucsina de animales control (A)  
y tratados (B).400X

94

Fig.30. Páncreas teñido con Tricromica de Mallory-Hematoxilina  
de animales control (A) y tratados (B).100X

94

Fig.31. Islote pancreático teñido con Tricromica de Mallory-Hematoxilina de animales control (A) y tratados (B).400X

95

Fig.32. Páncreas teñido con Tricromica de Mallory de control (A) y tratados (B).400X

95

Fig.33. Islote pancreático teñido con Tricromica de Mallory de animales control (A) y tratados (B).400X

96

Fig.34.- Fig.34. Cortes semifinos de hígado teñido con Azul de Toluidina de animales control (A) y tratados (B).100X

97

Fig.35. Cortes finos de hígado de animales control (A) y tratados (B). Ur-Pb, 4400X

97

Fig.36. Cortes semifinos de páncreas teñido con Azul de Toluidina de animales control (A) y tratados (B).100X

98

Fig.37. Cortes finos de páncreas exocrino de animales control (A) y tratados (B). Ur-Pb, 3000X

98

Fig.38. Cortes finos de páncreas endocrino de animales control (A)  
y tratados (B).Ur-Pb, 12 000X

99

Fig.39. Cortes finos de células  $\beta$  pancreáticas de animales control (A)  
y tratados (B).Ur-Pb, 3000X

99

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1.- Complicaciones de la diabetes a largo plazo

52

Cuadro 2.- Clasificación de la diabetes mellitus según la ADA y la OMS.

57

Cuadro 3.- Clasificación de las sulfonilureas.

61

Cuadro 4.- Principales parámetros farmacocinéticos de las sulfonilureas.

62

Cuadro 5.- Dosis de sobrevivencia-mortalidad para el cálculo de la DL50.

78

Cuadro 6.- Comparación de glucosa basal y post-administración de  
Thelzán 101 e intervalo de dosis que produce efectos tóxicos para la etapa 1.

83

Cuadro 7.- Comparación de glucosa basal y post-administración de  
Thelzán 101 e intervalo de dosis que produce efectos tóxicos para la etapa 2.

84

## **ÍNDICE DE GRÁFICAS**

Gráfica 1.- Concentración plasmática de glucosa basal y post-administración de Thelzán 101 en la etapa 1.

86

Gráfica 2.- Concentración plasmática de glucosa basal y post-administración de Thelzán 101 en la etapa 2.

87

Gráfica 3.- Promedio de la concentración plasmática en un periodo de 2 meses observándose su desviación estándar.

88

Gráfica 4.- Promedio de la masa corporal en un periodo de 2 meses observándose su desviación estándar.

89

## ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AMPc	Adenin Monofosfato Cíclico
Arg	Arginina
ATP	Adenin Trifosfato
CDR	Cantidades Diarias Recomendadas
Da	Daltons
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DL50	Dosis Letal 50
DMID	Diabéticos Insulino Dependientes
DMNID	Diabéticos No Insulino Dependiente
GLP1	Péptido 1 Glucagonoide
Glucosa –6-p	Glucosa-6-fosfato
GLUT	Transportador de Glucosa
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos (Complejo Mayor de Histocompatibilidad).
ICZ	Insulina Cristalina Zinc
ILA	Insulin Like Activity
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IPZ	Insulina Protamina Zinc
IRI	Inmunoreactive Insulin
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
Lys	Lysina
MODY	Maturity-Onset Diabetes of Young
NPH	Neutral-Protamin-Hagedorm

OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PC	Proteasa C
PIV	Polipéptido Intestinal Vasoactivo
PKC	Proteína Quinasa C
PP	Polipéptido Pancreático
PPARg	Subtipo g del Receptor Nuclear de Proliferación Activado por Peroxisomas
Proteínas LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
RER	Retículo Endoplásmico Rugoso
SSF	Solución Salina Fisiológica
UGDP	University Group Diabetes Program
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study Group

## RESUMEN

La diabetes mellitus es la enfermedad metabólica más común, ya que afecta de un 2 a un 7% de la población mundial. La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por los altos niveles de glucosa en la sangre causados por defectos en la producción de insulina, en la acción de la insulina, o en ambas.

La diabetes puede provocar graves complicaciones y muerte prematura, pero las personas con diabetes pueden tomar medidas para controlar la enfermedad y disminuir el riesgo de sufrir complicaciones. La diabetes es una enfermedad crónica que hasta el día de hoy, no tiene cura.

En este trabajo utilizamos el compuesto Thelzán 101 que previos estudios clínicos han demostrado que posee características hipoglucemiantes. El objetivo de este estudio fue calcular la dosis letal media del compuesto Thelzan 101 así como probar si disminuía los niveles de glucosa sanguínea y un posible efecto regenerador de células  $\beta$  pancreáticas; además, determinar el posible efecto hepatotóxico producido por el compuesto. El trabajo fue dividido en tres etapas: en la primera etapa, se emplearon 12 ratas Wistar macho en estado normoglicémico y distribuidas en cuatro lotes, al primer lote sólo se le administró SSF, y a los siguientes tres se les administraron dosis de 10, 100 y 1000mg/mL, respectivamente, basándose en la tabla de supervivencia-mortalidad propuesto por Dietrich-Lorke, se seleccionaron las dosis para la etapa 2, donde, se utilizaron 12 ratas Wistar macho las cuales fueron distribuidas en cuatro lotes: al primero, sólo se le administró SSF, a los siguientes tres se les administraron dosis de 20, 40, 80 y 160mg/mL, respectivamente, finalmente se obtuvo la media geométrica para las dosis donde la correlación supervivencia-mortalidad fue 0/1 y 1/1, y la dosis letal media obtenida para Thelzán 101 fue: 113.137mg/kg. Además obtuvimos que la disminución de los niveles de glucosa es directamente proporcional a la dosis administrada de Thelzán 101.

La etapa tres consistió en la administración permanente (durante 2 meses) del compuesto Thelzán 101 a los animales sobrevivientes de las etapas anteriores y empleando como lote control el mismo lote empleado en etapas anteriores; la administración de Thelzán 101 fue 2 veces a la semana y se le hizo una medición de glucosa sanguínea semanalmente. Al término de estos dos meses observamos que los niveles de glucosa en los lotes a los cuales se les administró Thelzán 101, estuvieron por debajo de los niveles del lote control así como también observamos que la administración de Thelzán provocó una disminución en la masa corporal de los animales a los cuales se les administró.

Al término de estos dos meses, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el hígado y páncreas los cuales fueron analizados mediante microscopía óptica y electrónica obteniendo que la administración de Thelzán 101 no produce efecto hepatotóxico ya que las muestras analizadas no mostraron diferencias entre el lote control y el lote tratado.

En cuanto al páncreas, pudimos observar que la administración de Thelzán 101 provoca una modificación ultraestructural lo cuál probablemente da como resultado una mayor cantidad de células  $\beta$  pancreáticas aunque se sugiere que los resultados sean revisados más minuciosamente en estudios posteriores.

## I. INTRODUCCIÓN.

La diabetes mellitus es la enfermedad metabólica más común, ya que actualmente afecta a más de 194 millones de personas en el mundo y se espera que alcance los 333 millones en 2025. Los **cinco países** con el mayor número de habitantes con diabetes mellitus son India (32.7 millones), China (22.6 millones), Reino Unido (15.3 millones), Pakistán (8.8 millones) y Japón (7.1 millones); México, ocupa el noveno lugar de habitantes con diabetes mellitus en el mundo y se calcula que para 2025 ocupe el séptimo lugar.<sup>1,17,30</sup>

La diabetes mellitus se incrementó un tercio durante la década de los noventa, venciendo a la prevalencia de obesidad y envejecimiento de la población, posicionándose como **la cuarta causa de muerte** en la gran mayoría de los países desarrollados, y para el 2025, se espera que la prevalencia de diabetes se triplique en África, el este del Mediterráneo y el sureste Asiático; que se duplique en América y en el oeste del Pacífico al igual que en Europa.<sup>30</sup>

En México, en el 2004 se produjeron más de 50 mil muertes a consecuencia de enfermedades isquémicas del corazón. Esta cifra representa alrededor del 16% del total de muertes en el país, lo que ubica a las cardiopatías isquémicas como la primer causa de muerte en México, seguida por la diabetes mellitus (13%), teniendo a Veracruz como primer lugar de prevalencia.

La población en México de personas con diabetes fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones y de este gran total, 2 millones de personas no han sido diagnosticadas, siendo la diabetes mellitus tipo 2 las más común (90%).

Actualmente, 13 de cada 100 muertes en México son provocadas por la diabetes, donde el grupo de edad con más muertes por diabetes se ubica entre los 40 y los 55 años, afectando más a mujeres (15.4%) que a hombres (10.2%), siendo más frecuente en el medio urbano (63%) que en el medio rural (37%).<sup>1,17,30,44</sup>

Si a todo esto le agregamos que México se encuentra en 2° lugar de obesidad en el mundo (24.4% prevalencia), sólo después de Estados Unidos y teniendo que 2 de

cada 3 personas mayores de 20 años en México tienen sobrepeso, y que de un 60 a 80% de la población nacional padece sedentarismo, el problema se incrementa aún más.<sup>30</sup>

En una persona con diabetes la obesidad disminuye hasta 8 años la esperanza de vida; además, es factor de riesgo de diabetes tipo 2 (cada kilogramo de exceso de peso en la población aumenta 5% la prevalencia de diabetes), enfermedades del corazón, hipertensión y dislipidemias.

Las complicaciones de la diabetes mellitus, como ceguera, falla renal y enfermedad cardíaca, son una **gran carga para los servicios de salud**. Se estima que los gastos destinados a la diabetes ocupan entre 5% y 10% de los presupuestos de salud de las naciones.

Los costos humanos y económicos de la diabetes podrían ser significativamente disminuidos si se invierte en prevención, particularmente en detección temprana, en razón de prevenir el desarrollo de las complicaciones por diabetes.

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) de nuestro país estima que el gasto anual por diabetes en más de 3 mil millones de pesos (317 millones de dólares).

El INSP también indica que el gasto anual por diabetes equivale a:

- 4.7% del gasto público para la Secretaría de Salud (38 millones de dólares).
- 6.5% del gasto para IMSS e ISSSTE (103 millones de dólares).

En el caso de consulta externa, la diabetes:

- Es la principal causa de demanda de consulta externa en instituciones públicas y privadas.
- Constituye 20% de la atención hospitalaria con un mayor número de días de estancia.

En la actualidad, se ha incrementado la utilización de los productos de fitoterapia debido a la creciente evidencia sobre su seguridad y eficacia, así como por la reducción de gastos en el tratamiento de las enfermedades<sup>48</sup>. Los siguientes factores han jugado un papel importante en esta evolución<sup>48</sup>:

- El descubrimiento de efectos adversos en fármacos de síntesis.
- El mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus productos derivados.
- El desarrollo de métodos analíticos que facilitan el control de calidad.
- El desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de los medicamentos fitoterápicos.

Son prescritos principalmente por médicos generales o utilizados en régimen de automedicación, con frecuencia tras el consejo de profesionales sanitarios no médicos, especialmente farmacéuticos.<sup>15,34</sup>

## **CAPITULO 1.**

### **Fitoterapia.**

La fitoterapia, etimológicamente “terapia con plantas” se define como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico.<sup>3,15,34</sup>

El término fitoterapia suele aplicarse a la utilización terapéutica de productos con una toxicidad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios, que dan lugar a tratamientos menos agresivos y que hacen de la fitoterapia una terapéutica suave. La fitoterapia se considera especialmente útil en el tratamiento de afecciones leves o moderadas, así como de afecciones crónicas.<sup>15,34</sup>

Para situar los límites de la fitoterapia en la terapéutica actual, debemos partir de las siguientes premisa.<sup>34</sup>

- Si bien los productos fitoterápicos suelen tener márgenes terapéuticos más amplios y suelen dar menos efectos secundarios que los fármacos sintéticos, *natural no es sinónimo de inocuo.*
- Actualmente, existe una base científica que apoya la eficacia de muchos productos fitoterápicos para determinadas indicaciones.
- La eficacia se consigue sólo con el uso adecuado de los preparados fitoterápicos, tanto en lo que se refiere a las indicaciones como a la forma de administración.

### **Fitofármaco.**

Una definición práctica se desprende de las dos raíces de la palabra “fitofármaco”: “fito” procede del griego y significa planta, y “fármaco” que es el medicamento.

Por lo tanto, en términos generales los fitofármacos son medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas.<sup>34,36</sup>

En nuestro país los fitofármacos, al igual que en la mayoría de los estados de la Unión Europea, se incluyen en la Ley 25/90 del Medicamento en la categoría de medicamentos.<sup>34</sup>

Los fitofármacos en sentido estricto se definen mediante los siguientes dos criterios:

**1. Son fármacos que contienen, como sustancias activas, preparaciones de partes vegetales en una forma galénica específica.**

La preparación a partir de partes vegetales puede ser:

- a) Partes vegetales cortadas o pulverizadas.*
- b) Jugos de partes de plantas.*
- c) Tinturas, maceraciones en aceites, destilados.*
- d) Extractos de partes de plantas, obtenidos mediante solventes dentro del marco de varios procedimientos.*

Como formas galénicas se encuentran especialmente:

- a) Polvos, gránulos.*
- b) Gotas, jugos, soluciones.*
- c) Cápsulas, comprimidos, grageas.*
- d) Ampolletas, infusiones.*
- e) Pastas, ungüentos, geles y cremas.*

**2. Son fármacos que forman parte de una terapia medicamentosa racional en el sentido de la medicina científica y se emplean para el tratamiento de enfermedades o padecimientos definidos (Hänsel/Haas).**

Los fitofármacos modernos se someten a la comprobación de eficacia y tolerancia según los métodos de determinación de la medicina académica.

La comprobación del efecto se realiza, esencialmente, mediante experimentos farmacológicos y la de eficacia mediante estudios clínicos o a través de la experiencia médica.<sup>3,15,34</sup>

Presentado en forma sencilla, un fitofármaco en sentido estricto se diferencia de un “fármaco químico” en que contiene como principio activo una preparación vegetal

en lugar de una sustancia química sintetizada. Por esta razón, predominan los “extractos” de preparación de plantas.

Es evidente que los productos mencionados a continuación no corresponden a la definición relevante para la práctica de los fitofármacos en sentido estricto con base en los dos criterios anteriores:

- a) *Fármacos homeopáticos*
- b) *Fármacos antroposóficos*
- c) *“Remedios naturales”, sentido tradicional de la expresión, “remedios caseros”, entre otros.*

Si un fitofármaco contiene, como principio activo, un solo extracto vegetal se conoce como monopreparado. Si contiene dos o más extractos con principios activos se conoce como preparado de combinación.<sup>3,15,34</sup>

**Los fitofármacos, en sentido estricto, son fármacos:**

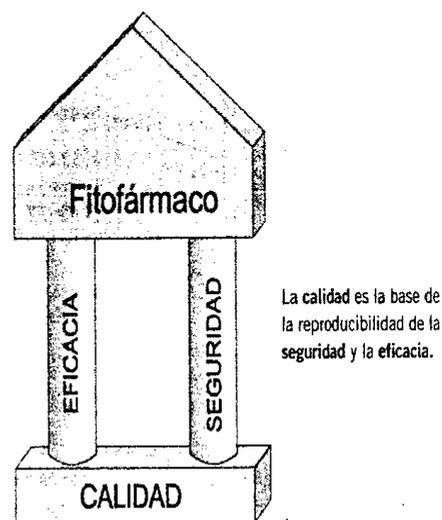
- *Que contienen como principio activo preparaciones vegetales, sobre todo extractos estandarizados, a diferencia de los “fármacos químicos”.*
- *Que se elaboran en preparaciones galénicas normales como son gotas, comprimidos, grageas, cápsulas o cremas.*
- *Que se emplean en el campo de la medicina científica.*
- *Cuyos efectos farmacológicos se prueban mediante experimentos y cuya eficacia clínica se demuestra en estudios clínicos y en la práctica médica.*

Uno de los factores clave para el desarrollo de una fitoterapia racional es disponer de medicamentos a base de plantas que, como cualquier otro medicamento, tengan garantizados su calidad, seguridad y eficacia.<sup>48</sup>

***Calidad.***

La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significación intrínseca, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproductibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia (Bauer, 1998; Bauer y Tittel, 1996; Busse, 2000; Franz y Vlietinck, 2001).<sup>3,34</sup>

Para poder realizar la evaluación de la calidad de los fitofármacos en algunos casos se requiere la utilización de diversos métodos analíticos, particularmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC) y la espectrometría de masas (EM), estos métodos permiten la valoración de constituyentes y la obtención de su “huella dactilar” (perfil cromatográfico) (Lazarowich y Pekos, 1998).<sup>34</sup>



**Fig.1.** La calidad de los medicamentos a base de plantas medicinales.<sup>34</sup>

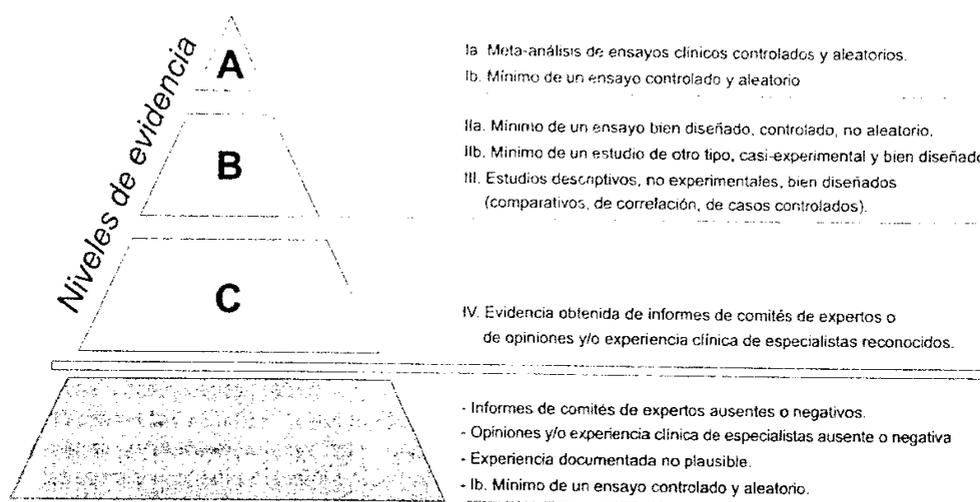
### ***Seguridad.***

Muchos fármacos que provienen de la medicina tradicional y han sido utilizados durante siglos, proporcionan cierta garantía de su inocuidad, principalmente en lo que a toxicidad aguda se refiere. Sin embargo, a pesar de que los fármacos vegetales y derivados suelen presentar un margen terapéutico amplio, no están exentos de posibles efectos adversos, interacciones y contraindicaciones. De ahí que la evaluación de su seguridad, debe efectuarse con los criterios aplicados a otros medicamentos y debe sustentarse, siempre que sea posible, en la existencia de documentación científica relevante sobre su toxicidad, efectos secundarios, interacciones, contraindicaciones, mutagenicidad, etc.<sup>34</sup>

### ***Eficacia.***

Existen diferentes parámetros que contribuyen a demostrar la eficacia de un preparado de fitoterapia. Entre estos parámetros se encuentra el conocimiento de los principios activos del fármaco, los resultados obtenidos en ensayos farmacológicos experimentales y la experiencia clínica.

Para la evaluación de la eficacia clínica, se reconocen diversos niveles de evidencia, (Fig.2). La tendencia actual es que las exigencias para el reconocimiento de la eficacia y que la documentación requerida para apoyar una determinada indicación dependan del tipo y gravedad de la indicación. Así, para el tratamiento de alteraciones menores, un menor nivel de evidencia puede ser adecuado, que deberá evaluarse conjuntamente con otros parámetros, como nivel de riesgo, experiencia de uso, existencia de datos farmacológicos experimentales, etc.<sup>34</sup>



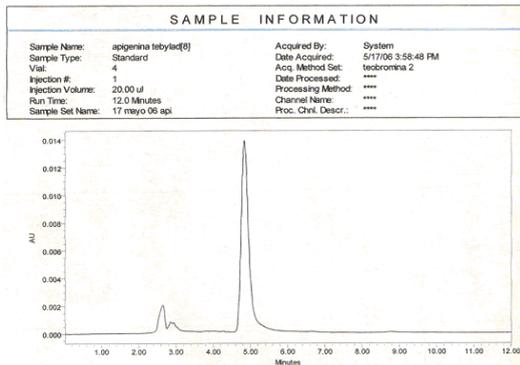
**Fig.2.** Niveles de evidencia para el reconocimiento de eficacia de acuerdo con Agency for Health Care Policy and Research de EE.UU y la OMS.<sup>34</sup>

### **Thelzán 101.**

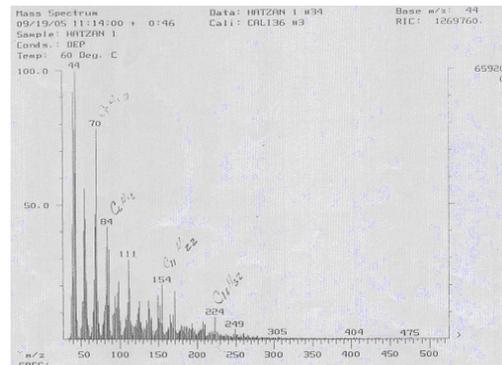
El compuesto Thelzán 101 es un fitofármaco desarrollado por los laboratorios Thelzán de México S.A de C.V., el cuál está constituido por dos plantas que en medicina tradicional se emplean para el tratamiento de la diabetes mellitus; estas plantas son: la Tecoma Stans y la Vaccinium Myrtillus.

Al compuesto Thelzán 101 se le han realizado diversos estudios tanto de cristalografía (Fig.5), como de espectrometría para elucidar su naturaleza estructural,

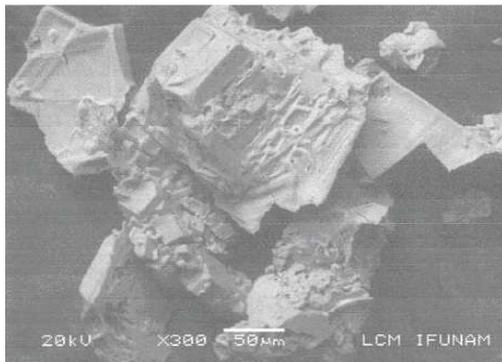
dentro de ellos se encuentran: espectroscopia por infrarrojo (Fig.6), espectrometría de masas (Fig.4), así como cromatografía de líquidos (Fig.3), entre otras.



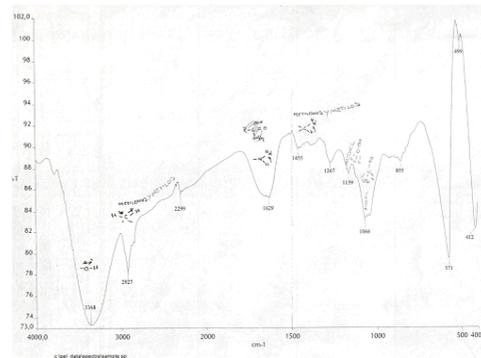
**Fig.3.** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Masas



**Fig.4.** Espectrometría de Masas



**Fig.5.** Cristalografía Infrarrojo



**Fig.6.** Espectroscopia por Infrarrojo

Mediante dichos estudios, se ha podido localizar que el principio activo que le confiere la característica de agente hipoglucemiante es la Apigenina.

### Apigenina.

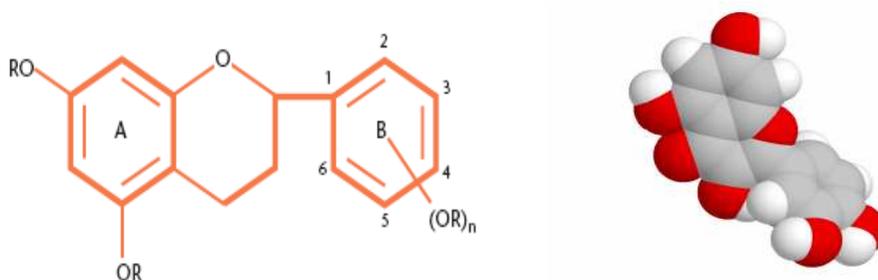
La apigenina es un derivado de las flavonas, grupo perteneciente a los flavonoides, es por eso, que al hablar de apigenina es necesario hablar de flavonoides.<sup>49</sup>

### Flavonoides.

Entre las sustancias de carácter fenólico, los que han sido objeto de estudios más profundos son los flavonoides. Comprenden un gran grupo de metabolitos secundarios

que derivan de subunidades que provienen de las rutas metabólicas del acetato y del shikimato.

Se encuentran casi exclusivamente en plantas superiores, y se presentan de dos modos muy característicos: enlazados a unidades glucídicas (flavonoides glucósidos), o libres (flavonoides agliconas), como es el caso de las flavanonas (catequinas y proantocianidinas). Invariablemente, tienen una unidad C<sub>15</sub>, como se muestra en la Fig. 7.<sup>3,15,34,49</sup>



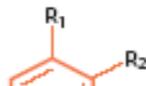
**Fig. 7.** Estructura química de los flavonoides<sup>49</sup>

### Nomenclatura y tipos.

Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C<sub>3</sub>. De acuerdo con esto, los flavonoides se clasifican en varios grupos: chalconas, flavonas flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc.

La mayoría de agliconas flavonoides tienen nombres triviales con la terminación INA u OL. La quercetina es un flavonol y corresponde al 5,7,3',4'-tetrahydroxiflavonol. La naringenina es una flavanona y corresponde a la 5,7,4'-trihydroxiflavanona. En el caso de los glucósidos flavonoides, es muy común nombrarlos con relación al nombre trivial de la aglicona. Por ejemplo, la apigenina corresponde a la 5,7,4'-trihydroxiflavona y la vitexina corresponde al 8- C-D-glucopiranosido de apigenina.<sup>34,49</sup>

Flavonas



**Fig.8.** Derivados de los flavonoides.<sup>49</sup>

### **Acción biológica.**

Desde hace muchos años se les han reconocido a los polifenoles una serie de acciones beneficiosas para la salud. Tal es el caso de la citrina, que fue el primer flavonoide al que se le atribuyó una actividad biológica bien definida sobre la permeabilidad vascular, recibiendo por ello el nombre de vitamina P. La citrina es una mezcla de glucósidos flavonoides, principalmente quercetina, rutina, hesperidina y eriodictina.<sup>49</sup>

- **Acción antioxidante.**

Dentro de esta acción, destaca su capacidad protectora sobre las proteínas LDL. De esta manera, se puede explicar su pluralidad de acciones, ya sea como antioxidantes primarios antirradicalarios o como sustancias reductoras, como agentes sinérgicos, o como quelantes de metales de transición.

- **Acción quelante.**

Los iones de metales como hierro y cobre, pueden catalizar la producción de radicales libres. La capacidad quelante de los flavonoides sobre ellos parece contribuir a su actividad antioxidante *in vitro*.

- **Efectos sobre el sistema de señalización celular.**

Estas vías regulan numerosos procesos en la célula, incluyendo el crecimiento, la proliferación y la muerte celular (apoptosis). Incluyen a los receptores de membrana (de superficie e intracelulares), las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasa.

○ **Acción termogénica.**

Un estudio demostró la eficacia del extracto de té verde, rico en polifenoles y cafeína, que incrementa el gasto energético y la oxidación grasa en humanos.

○ **Acción mutagénica y cancerígena.**

En los polifenoles con estructuras derivadas del flavonol, como la quercetina, la miricetina y el camferol, han dado resultados positivos de mutagenicidad con la prueba de Ames (desarrollado sobre *Salmonella typhimurium*). Por su carácter electrófilo, estas quinonas son muy reactivas y pueden participar en el ciclo de producción de los radicales superóxidos y peróxidos, lo que explicaría sus propiedades mutagénicas y cancerígenas.

○ **Acción anticancerígena.**

La acción anticancerígena de los flavonoides destacaría a través de cinco procesos:

- *Estimulación de la desintoxicación enzimática de la fase II.* Los flavonoides serían agonistas de las enzimas de desintoxicación de la fase II que catalizan las reacciones que promueven la excreción de productos químicos potencialmente tóxicos o carcinógenos.
- *Preservación de la regulación normal del ciclo celular.* Activando los caminos que conduce a la muerte de la célula (apoptosis) si el daño en la replicación del ADN ha sido irremediable.
- *Inhibición de la proliferación y activación de la apoptosis.*
- *Inhibición de la invasión del tumor y de la angiogénesis.* Los tumores invasores deben desarrollarse en los vasos sanguíneos nuevos por un proceso conocido como angiogénesis para aprovisionarse de nutrientes en su rápido crecimiento. Los flavonoides evitarían que las células cancerosas invadan el tejido normal (proceso conducido por las enzimas llamadas metaloproteinasas).
- *Disminución de la inflamación.* Ésta puede dar lugar a una producción local y creciente de radicales libres por las enzimas inflamatorias, así como el lanzamiento de los mediadores que promueven la proliferación y la angiogénesis de la célula, y que simultáneamente inhiben la apoptosis.

○ **Acciones específicas de los polifenoles.**

Los flavonoides se han aislado de muchas drogas vegetales debido a que son productos naturales muy comunes. A sus polifenoles se les ha atribuido una cantidad de acciones que van desde actividades inhibitorias de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasas, ATPasas, liasas, hidroxilasas, transferasas, oxidorreductasas y cinasas), hasta acción antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana y antiviral.

Su uso para el tratamiento de la fragilidad capilar es motivo de controversia, pero sin embargo se utiliza para el tratamiento de la hipertensión y en geriatría. Las flores de saúco (*Sambucus niger*), usadas para el tratamiento de resfriados, gripe y reumatismo, contienen varios glicósidos flavonoides. Una cantidad de isoflavonas (derivados de la 3-fenil-cromona), poseen actividad estrogénica y producen esterilidad en las ovejas que consumen trébol. La silibina y la silimarina son flavolignanos constituyentes del cardosanto (*Silybum marianum*), que se utiliza mucho en Alemania como hepatoprotector. Algunos dímeros flavonoides (biflavonoides), como el diinsinínol, tienen acción antiinflamatoria. La quercetina y la rutina tienen efectos anticancerígenos potenciales.<sup>49</sup>

También hay algunas evidencias de que los consumidores de vinos tintos presentan baja mortalidad por enfermedad coronaria, y que ello se debe, al parecer, a sus compuestos fenólicos, entre los que están flavonoides: catequina, epicatequina y quercetina. Las procianidinas presentes en las uvas tienen uso potencial en isquemias cardíacas.

También se han descrito flavonoides que inhiben la agregación plaquetaria, con acción vasodilatadora (naringenina, eriodictyol y luteolina), con acción antiarrítmica, chalconas, así como con acción antimicótica y antibacteriana. La 3-ramnosilquercetina presenta actividad antidiarreica, y otras isoflavanquinonas poseen potente actividad antiinflamatoria y antialérgica. Hay flavonoles con actividad antiespasmolítica, mientras que isoflavonas y flavanonas poseen propiedades antimicóticas. Hay isoflavanos antimicrobianos y flavanos con actividad leishmanicida. Las antocianinas, por sus características, se han sugerido como colorantes de alimentos. Además, se ha descrito el uso potencial de ciertos flavonoides en cosméticos.<sup>49</sup>

*Tecoma stans*.<sup>3,15,34</sup>

### Nombres comunes en México.

Tronador, Tronadora, Saúco amarillo, Lluvia de oro, Campanas amarillas, Palo de arco (Rep. Mex.); Batilimi, Matilimi (Chis.); Borla de San Pedro, Hierba de San Pedro (S.L.P.); Candox (Chis.); Xk'anlol, Xkantol (l. maya, Yuc.); Corneta amarilla (Dgo); Flor de San Pedro (Mex., S.L.P.); Gloria (Sin.); Guiabiche, Guie-bacaná, Guie-bichi, Trompeta (l. zapoteca, Oax.); Hierba de San Nicolás; Hoja de Baño (Gro.); Ichcuatl, Mixtontze, Ixontli (Pue.); Lipa-gundoflei (l. chontal, Oax.); Mazorca (Ver.); Miñona (N.L.); Nixtamalxochitl (l. nahuatl); Caballito (Son.); Retama (Mich., Gto., Jal.); Trompeta (Dgo.); San Pedro (Tamps., S.L.P., Mex.); Tulasúchil (Oax.); X-cantul (Yuc.); Xochimitl (Pue.).



**Fig.9.** Árbol, flor y tallo de la *Tecoma stans*.<sup>35</sup>

### Sinonimia.

*Bignonia frutescens* Mill. ex DC.; *Bignonia incisa* Hort ex DC.; *Bignonia stans* L.; *Gelsemium stans* (L.) Kuntze; *Stenolobium incisum* Rose & Standl; *Stenolobium quinquejugum* Loes; *Stenolobium stans* (L.) Seem; *Stenolobium stans* var. *apiifolium* (Hort. ex DC.) Seem; *Stenolobium stans* var. *multijugum* Fr.; *Stenolobium stans* var. *pinnatum* Seem.; *Tecoma incisa* Sweet; *Tecoma stans* var. *apiifolia* Hort. ex DC.; *Tecoma tronadora* (Loes.) Johnst.

### Descripción.

- Forma. Árbol pequeño o arbusto bajo, perennifolio o caducifolio, de 1 a 10 m (hasta 20 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm.
- Flor(es). Inflorescencia en racimo terminal o subterminal, con 20 flores aproximadamente, sólo algunas abriendo al mismo tiempo; cáliz corto-cupular, de 4 a 7 mm de largo; corola color amarillo vivo, con 7 líneas rojizas en la garganta, tubular-campanulada, de 3 a 5 cm de largo. Las flores son muy vistosas pero débilmente fragantes.

- Fruto(s). Fruto una cápsula alargada, cilíndrica y dehiscente, café, ahusada hacia los extremos, de 7 a 21 cm de largo por 5 a 7 mm de ancho, la superficie lenticelada; se abre a lo largo para liberar muchas semillas muy finas.
- Semilla(s). Semillas pequeñas, aplanadas y aladas; cuerpo de la semilla de 7 a 9 mm de largo, alas blancoamarillentas, hialino-membranáceas, agudamente demarcadas del cuerpo de la semilla e incrementan el tamaño en 8 a 10 mm de ancho por 2 a 2.5 cm de largo.
- Sexualidad. Hermafrodita.
- Número cromosómico:  $n = 18$ .

### **Distribución.**

Ampliamente distribuido en casi toda la República.

Altitud: 0 a 1,500 (2,400) m.

Estados. Ags. B.C. B.C.S. Camp. Chis. Chih. Coah. Col. D.F. Dgo. Gto. Gro. Hgo. Jal. Mex. Mich. Mor. Nay. N.L. Oax. Pue. Qro. Q.Roo. S.L.P. Sin. Son. Tab. Tamps. Tlax. Ver. Yuc. Zac.

### **Habitat.**

Suele aparecer aislada en áreas alteradas, a orilla de carreteras, sobre faldas de serranías, barrancas y sitios pedregosos. Suelos: negro, café-arcilloso, rojizo, somero, calizo, arenoso, pedregoso, bien drenado.

### **Uso Medicinal.**

- *Raíz, flor, hoja, corteza, tallo.* Se reportan 54 usos diferentes y 56 componentes químicos para esta planta.
  - Usos: anemia, ácido úrico, asma, inflamación, dengue, analgésico, antiambiana, dolor de muelas, antipirético, sífilis, depurativo, diabetes,

enfermedades del corazón, enfermedades de la piel (llagas, salpullido, sarna), enfermedades gastrointestinales (pirosis, cólicos, diarrea, empacho, enteritis aguda, úlceras estomacales, evacuaciones fétidas, flatulencias, gastritis, disentería), enfermedades hepáticas (bilis, padecimientos del hígado), enfermedades respiratorias (resfriado común, antitusivo), enfermedades urinarias (diurético, hidropesía, afecciones renales), enfermedades ginecológicas, anorexia, antihelmíntico, vermífugo, diurética.

- Infusión de raíz: tónico en la atonía gastrointestinal, diurético, vermífugo y antisifilítico.
- Flor: remedio para la diabetes.
- Hoja, corteza (polvo): para curar llagas.
- El zumo de la raíz se usa para sanar heridas internas en niños.
- Hojas (infusión): calma los nervios, tónico para aliviar la gastritis, estimula el apetito.
- En Veracruz se hace un cocimiento de las flores y la corteza como remedio para los dolores de estómago. La Farmacopea mexicana atribuye a la planta propiedades eupépticas y la prescribe para la debilidad gastrointestinal y para aliviar la gastritis de origen alcohólico. Melífera (flor). Apicultura.

*Vaccinium myrtillus*<sup>3,15,34</sup>

#### **Nombres comunes en México.**

Arandano, Mirtilo.

#### **Sinonimia.**

Anavia (castellano), Arándano (castellano), Arando (gallego y/o portugués), Arusnica cucoriedkova (eslovaco), Bilberry (inglés), Black whortleberry (inglés), Burren myrtle (inglés), Dwarf bilberry (inglés), Dyeberry (inglés), Ericaceae (familia), Heidelbeere (alemán), Huckleberry (inglés), Hurtleberry (inglés), Mirtillo (castellano), Ráspano (castellano), Rasponera



**Fig.10.** Flor y fruto de la *Vaccinium myrtillus*<sup>35</sup>

(castellano), Uva do monte (gallego y/o portugués), Vaccinium arboreum (similar), Whinberry (inglés), Whortle-berry (inglés), Wineberry (inglés).

### **Principios activos:**

- Frutos: taninos catéquicos (5%), ácidos orgánicos, azúcares, inositol, pectina, carotenos, abundantes pigmentos antociánicos (0,50%): neomirtalina-delfinidol, cianidol, malvidol, petunidol. Flavonoides: rutósido.
- Hojas: abundantes taninos catéquicos (6-10%); hidroquinona, trazas de arbutósido; flavonoides derivados del quercetósido, ácidos triterpénicos (ursólico, oleanólico), glucoquinina: neomirtalina; sales minerales: hierro, manganeso, cromo; trazas de alcaloides quinolizidínicos: mirtina, epimirtina.

### **Uso Medicinal.**

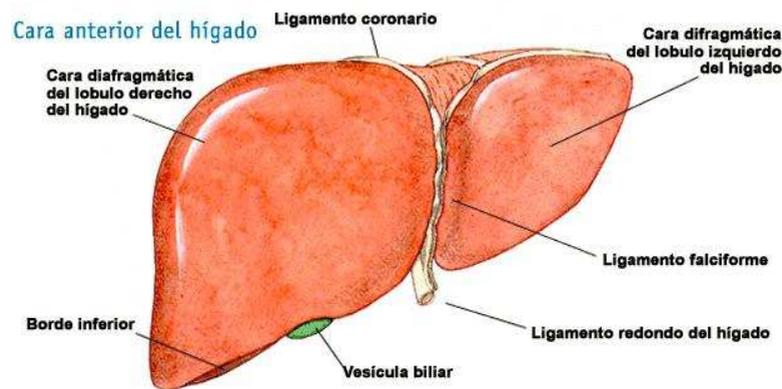
- Frutos: Los pigmentos antociánicos le confieren una acción como antiinflamatorio, antihemorrágico, vitamínico P (mejoran la microcirculación, aumentan la resistencia y controlan la permeabilidad capilar), contribuye a la regeneración de la capa vascular de la retina, aumentando la agudeza visual. Los taninos tienen una actividad como astringente (antidiarréico, hemostático local) y antiséptico.
- Hojas: Los taninos catéquicos ejercen una acción como astringente (antidiarréico, hemostático local) e hipoglucemiante, reforzada por la neomirtalina y las sales de cromo. El arbutósido es antiséptico urinario. Los extractos muestran actividad de antifúngico.
- Frutos: Varices, hemorroides, fragilidad capilar, arteriopatías, edemas por insuficiencia venosa, hemeralopia, retinitis pigmentaria, miopía.
- Hojas: Diarreas, diabetes, cistitis, uretritis, pielonefritis, vulvovaginitis. En uso externo: dermatomycosis, estomatitis, eczemas, heridas, úlceras dérmicas. En caso de gastritis o úlcera gastroduodenal, los taninos podrían provocar un aumento de las molestias. Debido al considerable contenido en hidroquinona de las hojas, debe prescribirse en forma de tratamientos discontinuos.

## CAPITULO 2.

### **HIGADO.**

El hígado es la glándula más grande de todo el organismo y la víscera de mayor tamaño. Recibe su irrigación a través de la vena porta, que trae la sangre venosa desde el intestino delgado, el páncreas y el bazo.<sup>11,18</sup>

Una de las principales funciones del hígado es degradar y conjugar las sustancias tóxicas para convertirlas en inocuas.<sup>2,11,18</sup>



**Fig.11.** Estructura del hígado.<sup>18</sup>

Está constituido por hepatocitos que tienen funciones endocrinas y exocrinas. La secreción exocrina del hígado, llamada bilis, contiene productos de desecho degradados y conjugados que son devueltos al intestino para su eliminación. La secreción endocrina es entregada directamente a la sangre que irriga a los hepatocitos: entre estas secreciones se encuentran la albúmina, las globulinas  $\alpha$  y  $\beta$  no inmunes, la protrombina, y glucoproteínas, así como también glucosa (proveniente del glucógeno almacenado) y la triyodotironina (producto de la desyodación de la tiroxina).<sup>2,11,18</sup>

### **Descripción.**

#### ***Configuración Externa.***

El hígado del adulto representa la mitad superior de un cuerpo ovoide, cuyo eje mayor es oblicuo hacia arriba y a la izquierda. Posee una parte derecha muy desarrollada hacia atrás y arriba, lateral a la columna vertebral. Ocupa la concavidad diafragmática derecha. Su extremidad izquierda se adelgaza y aplanada debajo del hemidiafragma izquierdo.<sup>18,25</sup>

Presenta dos caras y un borde:

- Cara diafragmática: comprende las caras tradicionalmente designadas anterosuperior y la parte extraperitoneal de la cara posterior.
- Cara visceral: comprende la cara inferior y la porción revestida del peritoneo de la cara posterior.
- Borde inferior: une las caras diafragmática y visceral.

### ***Aspecto General.***

El hígado es un órgano homogéneo, liso, de color rojo oscuro. Su peso, término medio en el adulto, es de 1.5kg. Lleno de sangre, el hígado resiste mal los traumatismos, ante los cuales se muestra bastante friable.

Su aspecto se modifica en numerosas enfermedades: turgente y verdoso en las retenciones biliares, retraído y fibroso en la cirrosis, achocolatado en los cánceres secundarios. Estos son sólo algunos ejemplos.<sup>18</sup>

### **Constitución Anatómica.**

El órgano está rodeado por el peritoneo y por una membrana propia, la cápsula fibrosa del hígado. Está constituido por una parénquima hepática semejante en todas las partes del hígado, del cuál salen los conductos excretores de la bilis.<sup>11,18</sup>

### ***Cápsula fibrosa del Hígado (de Glisson).***

Rodea por completo al órgano. Es delgada, poco resistente. Su cara superficial se adhiere al peritoneo, mientras que su cara profunda envía tabiques conjuntivos entre los lóbulos y lobulillos. A nivel del porta hepático, la cápsula se refleja en el interior de la

glándula, formando una vaina a los vasos y a los conductos biliares (cápsula fibrosa perivascular).

### ***Parénquima hepático.***

Está constituido por lobulillos hexagonales, separados por los espacios interlobulillares (de Kiernan), e interpuestos entre las circulaciones de aporte y de salida del hígado. Las células hepáticas se hallan adaptadas a la doble función exocrina y endocrina de la glándula.

### **Anatomía funcional.**

La anatomía no puede dar cuenta de las innumerables funciones aseguradas por el hígado; a lo sumo permite comprender cómo se evacuan los productos elaborados por el hígado para cumplir con sus dos funciones esenciales.<sup>2,11,18,25</sup>

- La secreción exocrina de la bilis, evacuada por los conductos biliares.
- Transformaciones humorales, a partir de la sangre venosa aportada por la vena porta hepática y la secreción de diversos productos que modifican de modo considerable la composición de la sangre evacuada por las venas hepáticas.

La hepatectomía total es incompatible con la vida, pero se puede privar al organismo de los dos tercios de la glándula. Ésta posee un enorme poder de regeneración.

## **PÁNCREAS.**

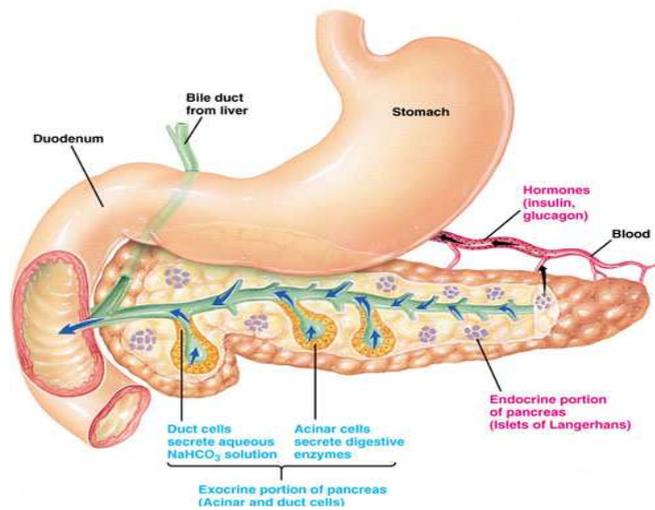
El páncreas es una glándula mixta:

- Su secreción externa (el jugo pancreático), es vertida en el duodeno por los conductos pancreático y pancreático accesorio.

- Su secreción interna (la insulina, el glucagón, la somatostatina y el polipéptido pancreático) se vierte en la sangre. Estas hormonas tienen una acción esencial en la regulación del metabolismo.

El páncreas se relaciona estrechamente con el duodeno, que enmarca su cabeza en el extremo derecho. Está íntimamente relacionado con el conducto colédoco. La porción izquierda del páncreas se afina en forma progresiva en dirección al bazo.<sup>11,12,32</sup>

Es un órgano profundo, adosado a la pared posterior del abdomen en una ubicación prevertebral; es retrogástrico y se relaciona por adelante con las regiones supracólicas e infracólicas del abdomen. La línea mediana deja un tercio del páncreas a la derecha y dos tercios a la izquierda.



**Fig.12.** Estructura del páncreas<sup>32</sup>

## Descripción.

### *Configuración Externa.*

El páncreas es una glándula de forma alargada de derecha a izquierda y algo menos de abajo hacia arriba, pero aplastada en sentido anteroposterior. Describe una concavidad posterior, moldeada sobre la columna lumbar a nivel de L1-L2. Se describe en él: una cabeza, un cuello, un cuerpo y una cola.<sup>11,12</sup>

- Cabeza.

La cabeza es la parte orientada algo hacia delante y a la derecha, enmarcada por el duodeno. Su borde superior y su borde derecho están excavados por un canal, en el cual se ubica el duodeno “como un neumático a su llanta” (Gregoire). El canal desaparece en el borde inferior de la derecha que está en contacto con la porción horizontal del duodeno.

- Cuello.

El cuello o istmo del páncreas une la cabeza al cuerpo. Es una porción algo estrecha, de aproximadamente dos centímetros de longitud.

- Cuerpo.

El cuerpo se aparta de la cabeza de la glándula, hacia la izquierda y hacia arriba. Por atrás es cóncavo. En un corte sagital paramediano, tiene la forma de un prisma con tres caras: anterior, posterior e inferior.

- Cola.

La cola es la extremidad izquierda. Prolonga al cuerpo y se afina formando una lámina hacia delante, dirigida hacia el hilio del bazo.

## **Constitución Anatómica**

### ***Conductos Excretorios.***

La glándula está formada por dos tejidos diferentes:

- La glándula de secreción externa con acinos glandulares, comparables a los de las glándulas salivares. Cada acino posee un conducto excretor para el jugo pancreático.
- La glándula de secreción interna está constituida por los islotes pancreáticos (de Langerhans), situados entre los acinos. Los islotes están rodeados por una rica

red vascular, que es la vía de eliminación de las hormonas producidas por las distintas células que los constituyen.

### ***Conducto Pancreático (de Wirsung).***

Se origina a nivel de la cola del páncreas y sigue el eje mayor del cuerpo de la glándula en dirección hacia la cabeza del páncreas, ubicado en el centro del órgano. La terminación del conducto pancreático está rodeada por la porción pancreática del esfínter de la ampolla pancreática. Durante su trayecto recibe innumerables conductos que los aborda por todas sus caras. Drena a los acinos de la cola, el cuerpo y la porción posterior de la cabeza del páncreas.<sup>11,12</sup>

### ***Conducto Pancreático Accesorio (de Santorini).***

Se separa del conducto pancreático a nivel de la cabeza del páncreas. Se distingue en sentido horizontal hacia la derecha y termina atravesando la pared posteromedial del duodeno, a unos 2 o 3 cm por arriba del conducto pancreático principal. Su orificio levanta la mucosa formando la papila duodenal menor. Este conducto drena la porción anterior de la cabeza del páncreas.<sup>11,12</sup>

### **Anatomía Funcional.**

La anatomía macroscópica sólo revela la secreción externa de la glándula, conducida al duodeno por los conductos excretores glandulares. La secreción se produce por reflejos suscitados por la llegada del quimo ácido al duodeno. La excreción es controlada por el músculo esfínter de la ampolla hepatopancreática, cuyo mecanismo delicado se opone al reflujo, no sólo del contenido duodenal (alimentos, jugo intestinal, jugo gástrico), sino también de la bilis, hacia el conducto pancreático. En caso de que se produjera este reflujo, activaría las enzimas del jugo pancreático y ocasionaría la autodigestión de la glándula, punto de partida de necrosis pancreática: la pancreatitis aguda hemorrágica, que puede ser mortal.

La glándula de secreción interna, generadora de hormonas (glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático) vierte su contenido en las venas tributarias de la vena porta hepática: la secreción interna del páncreas pasa, en primera instancia, por el hígado. Cuando existe una alteración de la secreción de insulina, con disminución de su cantidad, da origen a una enfermedad del metabolismo, primariamente, de los hidratos de carbono: *diabetes*.<sup>11,12,18,21,46</sup>

### **Páncreas Exocrino.**

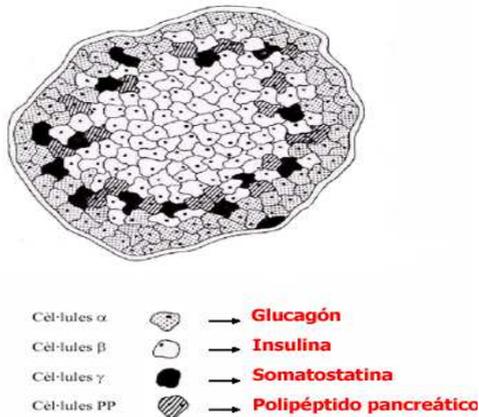
El páncreas exocrino contiene acinos que secretan una diversidad de enzimas a los conductos pancreáticos, por lo que la función exocrina del páncreas es desempeñada por las células acinosas, las células centroacinosas y los conductos intercalares. El conducto pancreático se abre en la papila duodenal, en 70% de las personas se une al colédoco a nivel de la ampulla de Vater. De modo ordinario, un conducto pancreático accesorio (menor) se abre de manera independiente al duodeno en un punto proximal a la papila.<sup>11,12,18,21</sup>

### **Páncreas Endocrino.**

El páncreas endocrino se constituye por islotes de Langerhans, que se distribuyen en todo el órgano, con una densidad máxima en la cola, y contienen varias células productoras de diferentes hormonas.<sup>11,12,18</sup>

Un páncreas humano adulto normal contiene cerca de 1 millón de islotes los cuáles constituyen el 2-3% del total de la masa de la glándula. Los islotes de Langerhans son estructuras microscópicas con diámetro de 50 a 250µm. A pesar de estas variaciones, la arquitectura interna de los islotes es característica; los islotes no están conectados con el sistema de conductos exocrinos, así los productos hormonales se secretan de manera directa a la corriente circulatoria.

Microscópicamente los islotes de Langerhans están constituidos por cuatro tipos celulares distintos: células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y PP. La proporción de células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y PP en un islote adulto es de 68:20:10:2 respectivamente.<sup>11,12</sup>



**Fig.13.** Distribución celular en el islote pancreático (de Langerhans) humano.<sup>12</sup>

La hormona más importante secretada por el páncreas es la *insulina*. Las células  $\beta$  de los islotes son la única fuente de insulina en el cuerpo, y la deficiencia de secreción de cantidades adecuadas de insulina da como resultado *diabetes mellitus*.<sup>11,12,18,21,46</sup>

El glucagón, secretado por las células  $\alpha$ , también desempeña un papel en el metabolismo de la glucosa. La función del glucagón es menos vital, y no se ha visto que la ausencia de glucagón cause alguna enfermedad clínica.

Las funciones fisiológicas del polipéptido pancreático (PP), y del polipéptido intestinal vasoactivo (PIV) no se ha dilucidado y se piensa que la cantidad de somatostatina y de gastrina secretada por las células  $\gamma$  del páncreas es demasiado reducida para que tenga algún papel fisiológico. No obstante la secreción excesiva de cualquiera de estas hormonas causa síndromes clínicos específicos.<sup>11,12,18,21</sup>

### **Control de la homeostasis de la glucosa.**

Dentro de las diferentes fuentes de energía que utiliza la célula, la glucosa es la principal. En los mamíferos, la regulación de la concentración de glucosa en sangre es esencial para el organismo, ya que estados de hiperglucemia o hipoglucemia extremos

pueden ser críticos para la supervivencia. En el hombre y en los mamíferos en general, la regulación de la concentración de la glucosa se realiza mediante un equilibrio entre el flujo de glucosa dentro y fuera del espacio extracelular a través de la secreción coordinada de insulina y el glucagón.<sup>36</sup>

Después de la ingestión de alimentos, el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa depende de tres procesos que ocurren simultáneamente de una manera coordinada.

1. En respuesta al incremento de la glucosa plasmática, se estimula la producción y secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  del páncreas.
2. El incremento en la glucemia e insulinemia induce a la captación de la glucosa por los tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo).
3. Se inhibe la secreción de glucagón, lo que suprime la producción hepática de glucosa.

La normoglicemia se mantiene gracias a la acción del glucagón y de otros factores hormonales y nerviosos, a través de un incremento en la producción de glucosa en el hígado (mediante la estimulación de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis). Alteraciones funcionales a nivel de célula  $\beta$ , hígado, músculo o tejido adiposo, pueden conducir a trastornos en la homeostasis de la glucosa, al desarrollo de intolerancia a la glucosa o, incluso, a diabetes mellitus.<sup>14,36</sup>

Para poder ser utilizada, la glucosa ha de ser transportada al interior de las células y, posteriormente, debe ser fosforilada a glucosa-6-fosfato (glucosa-6-P). El transporte lo realizan un sistema de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs), situadas en la membrana plasmática. A continuación, un grupo de proteínas citoplasmáticas, denominadas hexoquinasas se encarga de la fosforilación. La glucosa-6-P resultante podrá intervenir en las diferentes vías metabólicas, como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato o ser almacenada en forma de glucógeno.<sup>14,36</sup>

## **Insulina.**

La insulina es un polipéptido constituido por una cadena A , con 21 aminoácidos, y una cadena B, con 30 aminoácidos, ambos polipéptidos están unidos entre sí por dos puentes disulfuro que se extienden desde las cisteínas en las posiciones 7 y 20 de la cadena A, a las cisteínas 7 y 19 de la cadena B, respectivamente. Entre dos cisteínas de la cadena A (la 6 y la 11) se establece un tercer puente disulfuro (puente intracatenario). La presencia de estos puentes disulfuro son indispensables para la actividad biológica de la hormona; aunque los más importantes son los extremos de la cadena A y la parte intermedia de la B (Fig.16). Además para que haya un buen reconocimiento del receptor y una efectiva función biológica de la insulina depende también de la estructura tridimensional y en el caso de la insulina, de la tendencia espontánea a la autoagregación; la secuencia de los aminoácidos de la insulina fue establecida por Sanger y col.<sup>14,36</sup>

Una vez que la insulina es sintetizada y secretada al torrente circulatorio, se distribuye a los diferentes tejidos diana. Allí, esta hormona actúa a través de un receptor de membrana específico que pertenece a una familia de receptores que tienen actividad tirosina quinasa.<sup>14</sup>

### ***Biosíntesis de la Insulina.***

La estructura de la insulina y su gen han sido altamente conservadas durante la evolución, reflejando su determinante importancia en la regulación del metabolismo. En humanos, el gen que codifica para la preproinsulina, el precursor primario de la insulina, está localizado en el brazo corto del cromosoma 11p15.5.<sup>8</sup>



**Fig.14.** Ideograma del cromosoma 11.<sup>8</sup>

Posee tres exones: el primero codifica el péptido señal y el extremo N-terminal de la preproinsulina, el segundo la cadena B y parte del péptido C, y el tercero el resto del péptido C y la cadena A.

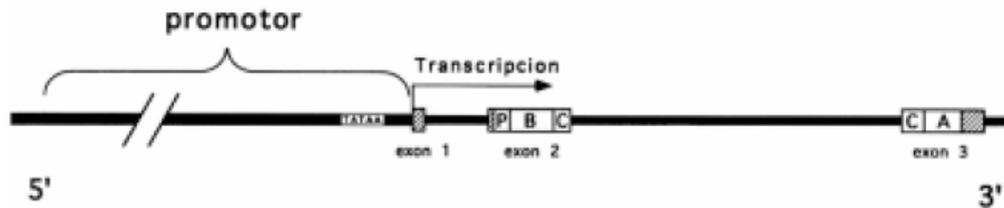


Fig.15. Representación de los exones que codifican a la insulina.<sup>8</sup>

### ***Metabolismo de la Insulina.***

El precursor de la insulina, *la preproinsulina* (PM=11 500Da), se sintetiza en los ribosomas e ingresa al retículo endoplásmico rugoso de la célula  $\beta$  y en éste es rápidamente dividido por enzimas microsómicas para formar *la proinsulina* (9 000Da).

La proinsulina, que consta de las cadenas A y B unidas por un péptido C de 31 aminoácidos, se transporta al aparato de Golgi y en éste se deposita en vesículas secretoras. Durante su estancia en las vesículas secretoras, la proinsulina se divide en dos sitios para formar la insulina (PM=5 808Da) y el fragmento biológicamente inactivo correspondiente al péptido C, dicha conversión implica la acción secuencial de proteasas específicas la PC1 (también conocida como PC3) y la PC2, que se encuentran presentes en los gránulos de almacenaje. Estas endopeptidasas rompen la molécula por lugares específicos: la PC1 es responsable de la ruptura entre Arg31 y Arg32 (Bailyes y col., 1992; Neerman-Arbez y col., 1993) y la PC2 entre Lys64 y Arg65 (Bennet y col., 1992) provocando la separación del péptido de conexión.<sup>24</sup>

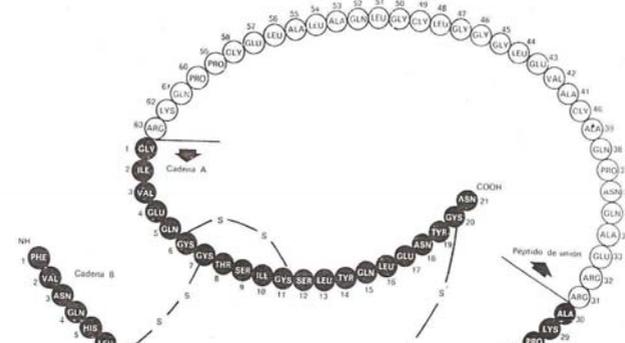


Fig.16. Representación de la insulina humana.<sup>24</sup>

La insulina es liberada de la células  $\beta$  por diversos estímulos (Fig.17), de los cuáles el más importante, desde el punto de vista fisiológico, es la glucosa y es transportada en el plasma con las globulinas  $\alpha$  y  $\beta$ . Y su secreción es inhibida por las catecolaminas y la somatostatina.<sup>24,42,47</sup>

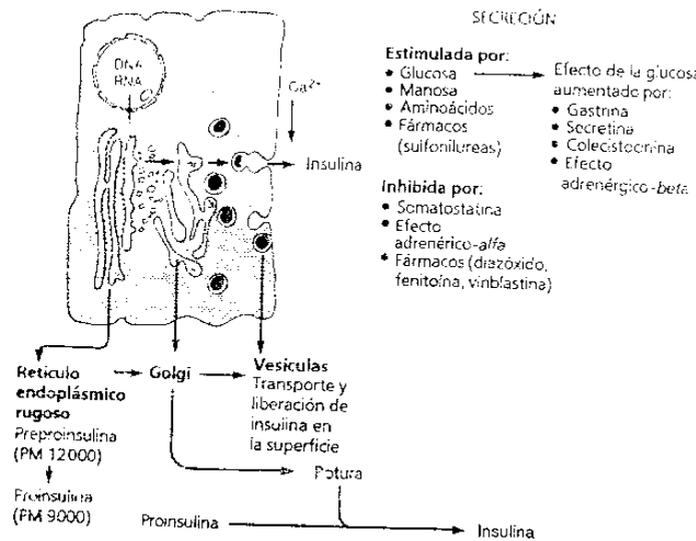
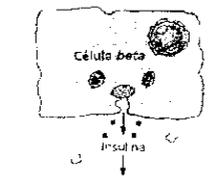


Fig.17. Síntesis y secreción de la insulina.<sup>47</sup>

La glucosa ingresa a las células  $\beta$  por medio de un transportador de glucosa que tiene escasa afinidad por la glucosa y, de esta manera, permite una respuesta graduada a la captación de glucosa, provocando la despolarización de la célula y así la exocitosis o emiocitosis de los gránulos con insulina.<sup>24,42,47</sup>



El enlace de la insulina a receptor libera un mensajero secundario que facilita el ingreso de la glucosa a la célula.

**Efecto Bioquímicos**

	Hígado	Musculo	Grasa
Después de una comida	<b>Aumento</b>	<b>Aumento</b>	<b>Aumento</b>
Nivel alto de insulina en el suero	Almacena más glucógeno	Almacena más glucógeno	Almacena más lípidos
En presencia de glucosa elevada	<b>Disminución</b>	<b>Disminución</b>	<b>Disminución</b>
Principalmente anabólico	Gluconeogénesis	Síntesis de proteínas	
	• Cetogénesis		
En estado de ayuno	<b>Aumento</b>	<b>Aumento</b>	<b>Aumento</b>
Nivel bajo de insulina en el suero	Glucogenólisis	Glucogenólisis	Lipólisis
Absencia de glucosa	Lipólisis	Proteólisis	
	• Gluconeogénesis		

También es posible inducir la secreción de la insulina inducida por la glucosa mediante varias hormonas entéricas como el péptido 1 glucagonoide (GLP1[7-36]).

### ***Acciones Metabólicas de la Insulina.***

**Fig.18.** Mecanismo de acción de la insulina sobre las células blanco y sus principales acciones biológicas.<sup>47</sup>

La función bioquímica principal de la insulina consiste en regular la transferencia de glucosa del plasma al interior del citoplasma de las células.<sup>24</sup>

La insulina ejerce su efecto al unirse a los receptores de insulina presentes en la superficie de las células blanco. Los receptores de insulina están presentes en el hígado, el músculo y grasa, aunque se han demostrado receptores en otras células.

La insulina circula libremente por el plasma, en el que tiene una vida media corta, que no alcanza los 15 minutos. La degradación ocurre en la mayoría de los tejidos, pero especialmente en el hígado, riñón y testículos.<sup>24,47</sup>

Después de una comida abundante, las concentraciones elevadas de insulina en la sangre inducen a los tejidos a captar y almacenar glucosa. Se estimula la glucogénesis en el hígado y en el músculo esquelético y la lipogénesis en el tejido adiposo.<sup>24</sup>

En ayuno, las concentraciones bajas de insulina producen como resultado la movilización de reservas del cuerpo para satisfacer las necesidades de energía del organismo. La glucogenólisis y la proteólisis en hígado y músculo esquelético proporcionan glucosa; la lipólisis en el tejido adiposo produce ácidos grasos libres, que penetran en la circulación y se metabolizan a cuerpos cetónicos en el hígado. Las células del cuerpo, con excepción de las encefálicas, utilizan ácidos grasos y cuerpos cetónicos para obtener energía, en estados de secreción baja de insulina.<sup>24</sup>

Los procedimientos para medir la insulina plasmática se basan en métodos biológicos que suelen denominarse ILA (*insulin like activity*) y por métodos de radioinmunoanálisis que se conocen como IRI (*immunoreactive insulin*). Los valores normales de insulina plasmática en condiciones basales suelen oscilar entre 10 y 25

microunidades/mL. Su elevación de la ingesta sigue a la de la glucemia, y suele alcanzar alrededor de los 150 microunidades/mL, a los 60 minutos postingesta.<sup>42,47</sup>

### ***Actividad Fisiológica.***

La actividad fisiológica de la insulina se manifiesta sobre el metabolismo de los carbohidratos, de las grasas y las proteínas. Aunque su efecto más llamativo sea su capacidad de reducir la concentración de glucosa del plasma, el resto de sus acciones no son menos importantes.<sup>24,42,47</sup>

- ***Carbohidratos.***

La insulina favorece el paso de glucosa a través de la membrana celular de las células musculares y adiposas. Aumenta la formación de glucógeno en la célula hepática. Funciona como activador de los sistemas enzimáticos que intervienen en la glucólisis y en la vía de las pentosas-fosfatos. Disminuye la glucemia, aumentando la utilización de glucosa en el músculo y tejido adiposo y disminuyendo la formación hepática de la misma.

- ***Grasas.***

Ejerce un efecto favorecedor de la lipogénesis sobre el adipocito; la entrada de glucosa en esta célula favorece la síntesis de triglicéridos a través de un mayor aporte de glicerol y acetil-CoA. También ejerce un efecto antilipolítico, mediado por el sistema adenilciclase-AMPC, a través del cual se produce una disminución de ácidos grasos libres liberados en el tejido adiposo. A nivel de hígado, frena la cetogénesis y tiende a disminuir los niveles de triglicéridos circulantes por activación de la enzima lipoproteinlipasa.

- ***Proteínas.***

La insulina ejerce un efecto anabólico sobre el metabolismo proteico. De un lado activando la entrada de glucosa en la célula muscular, y por otro, favoreciendo el transporte de aminoácidos al interior de la célula, y, además, estimulando la síntesis proteica y la de ADN. El freno de la neoglucogénesis ahorra aminoácidos que son utilizados en la formación de proteínas.

**Fig.19.** Efectos de la deficiencia de la insulina.<sup>47</sup>

### **CAPITULO 3.**

#### **Diabetes Mellitus.**

La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa, con grados variables de predisposición hereditaria, deficiencia relativa o absoluta de insulina y con participación de diversos factores personales y ambientales que afectan al metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas que se asocian fisiopatológicamente con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o en la acción de la insulina. Estos defectos traen como consecuencia una elevación anormal de la glucemia después de cargas estándar de glucosa e incluso en ayunas conforme existe mayor descompensación de la secreción de insulina.<sup>9,12,14,32,39,40</sup>

Con fines de diagnóstico y tratamiento la diabetes se clasifica en:

- Diabetes tipo 2 en la cual hay capacidad residual de secreción de insulina, pero estos niveles no superan la resistencia a la insulina concomitante y aparece la hiperglucemia.
- Diabetes tipo 1 caracterizada por la destrucción de células  $\beta$  con deficiencia absoluta de insulina, que a su vez se clasifica en: a) inmunitaria y b) idiopática.

La diabetes mellitus es una enfermedad familiar, mucho más frecuente en individuos homocigotos que en heterocigotos; aunque se ha sugerido que se hereda en forma autosómica recesiva.<sup>32</sup>

Un comité internacional de expertos en el campo, el taller de los National Institutes of Health reunidos en 1979, recomendó el empleo de los términos “diabetes tipo 1 y tipo 2” que es una clasificación terapéutica y con el uso de números arábigos en vez de números romanos, ya que el II en romano puede confundirse con el 11 y el término fue aprobado por la ADA.<sup>32</sup>

La diabetes tipo 1 se debe a la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos predominantemente por un proceso autoinmunitario y estos pacientes se encuentran propensos a la cetoacidosis.

La diabetes tipo 2 es la variable más prevalente y se genera por la resistencia a la insulina, sobre todo la producida por la obesidad visceral, con un defecto en la secreción compensadora de insulina.<sup>9,12,14,32,39</sup>

### **Causas.**

- Diabetes Tipo 1:

La diabetes se manifiesta cuando el cuerpo no produce la cantidad suficiente de insulina para que los valores sanguíneos de glucosa se mantengan normales, o cuando las células no responden adecuadamente a la insulina. En la denominada diabetes mellitus tipo 1 (diabetes insulino dependiente), la producción de insulina es escasa o nula.

A pesar de tratarse de una enfermedad con una alta prevalencia, sólo el 10 por ciento de todos los diabéticos tiene la enfermedad tipo 1. La mayoría de los pacientes que padecen de diabetes tipo 1 desarrollan la enfermedad antes de los 30 años.<sup>12,14</sup>

Los científicos creen que un factor ambiental (posiblemente una infección vírica o un factor nutricional en la infancia o en la adolescencia) provoca la destrucción por el sistema inmunitario de las células que producen la insulina en el páncreas. Es más probable que sea necesaria una predisposición genética para que esto ocurra. Sea como fuere, en la diabetes tipo 1, más del 90 por ciento de las células que producen la insulina en el páncreas (células  $\beta$ ) son destruidas. La deficiencia insulínica consiguiente es grave y, para sobrevivir, una persona con esta afección debe inyectarse insulina con regularidad.<sup>12</sup>

- Diabetes Tipo 2:

En la diabetes mellitus tipo 2 (diabetes no insulino dependiente), el páncreas continúa produciendo insulina, incluso a valores más elevados que los normales. Sin

embargo, el organismo desarrolla una resistencia a sus efectos y el resultado es un relativo déficit insulínico. La diabetes tipo 2 aparece en los niños y en los adolescentes, pero por lo general comienza después de los 30 años y es más frecuente a partir de esa edad. Alrededor del 15 por ciento de los pacientes mayores de 70 años padecen diabetes tipo 2. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes tipo 2, ya que los obesos se cuentan entre el 80 y el 90 por ciento de las personas que sufren esta enfermedad, según estudios realizados por la Universidad de Pensilvania, es debido a una hormona sintetizada por los adipositos conocida con el nombre de “resistina”; los efectos de esta hormona sobre el metabolismo de la glucosa son antagonistas con los de la insulina.<sup>49</sup>

Asimismo, ciertas etnias raciales y grupos culturales corren un mayor riesgo (las etnias negras e hispanas tienen el doble o el triple de riesgo de desarrollar este trastorno), siendo frecuentes los antecedentes familiares.<sup>12,14</sup>

Otras causas menos comunes de la diabetes son valores anormalmente altos de corticosteroides, el embarazo (diabetes gestacional), los fármacos y sustancias tóxicas que interfieren con la producción o los efectos de la insulina, aumentando los valores de azúcar en sangre y muchas otras.<sup>8,14,24</sup>

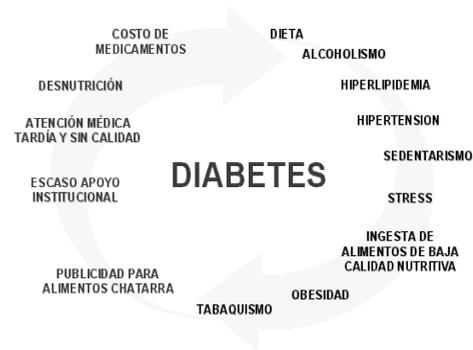


Fig.20. Algunas causas de la diabetes.<sup>24</sup>

### Síntomas de la diabetes.

Los alimentos digeridos en el estómago y el intestino son transformados a glucosa, aminoácidos y lípidos. Una vez que la glucosa pasa a la sangre, se convierte en la fuente principal de energía de la mayoría de las células del organismo.

Para que pueda ser introducida y utilizada eficazmente por las células, la glucosa necesita la ayuda de la insulina, producida por las células  $\beta$  del páncreas.

Cuando existe una deficiencia de insulina, la glucosa es incapaz de entrar en las células del organismo y permanece en la sangre, elevando su nivel por encima de los límites normales. Al mismo tiempo, las células, en las que no ha entrado la glucosa, sufren la falta de su principal fuente de energía.<sup>9,12,14,32</sup>

Los primeros síntomas de la diabetes se relacionan con los efectos directos de la alta concentración de azúcar en sangre. Cuando este valor aumenta por encima de los 160 a 180 mg/dL, la glucosa pasa a la orina. Cuando el valor es aún más alto, los riñones secretan una cantidad adicional de agua para diluir las grandes cantidades de glucosa perdida. Dado que producen orina excesiva, se eliminan grandes volúmenes de orina (poliuria) y, en consecuencia, aparece una sensación anormal de sed (polidipsia). Asimismo, debido a que se pierden demasiadas calorías en la orina, se produce una pérdida de peso y, a modo de compensación, la persona siente a menudo un hambre exagerada (polifagia).<sup>9,14,40</sup>

Otros síntomas comprenden visión borrosa, somnolencia, náuseas y una disminución de la resistencia durante el ejercicio físico. Por otra parte, si la diabetes está mal controlada, los pacientes son más vulnerables a las infecciones. A causa de la gravedad del déficit insulínico, es frecuente que en los casos de diabetes tipo 1 se pierda peso antes del tratamiento. En cambio, no sucede lo mismo en la diabetes tipo 2.

En los diabéticos tipo 1 los síntomas se inician de forma súbita y pueden evolucionar rápidamente a una afección llamada cetoacidosis diabética. A pesar de los elevados valores de azúcar en la sangre, la mayoría de las células no pueden utilizar el azúcar sin la insulina y, por tanto, recurren a otras fuentes de energía. Las células grasas comienzan a descomponerse y producen cuerpos cetónicos, unos compuestos químicos tóxicos que pueden producir acidez de la sangre (cetoacidosis). Los síntomas iniciales de la cetoacidosis diabética son: sed y micción excesivas, pérdida de peso, náuseas, vómitos, agotamiento y, sobre todo en niños, dolor abdominal. La respiración se vuelve profunda y rápida debido a que el organismo intenta corregir la acidez de la sangre. El

aliento de la persona huele a acetona. Si no se aplica ningún tratamiento, la cetoacidosis diabética puede progresar y llevar a un coma, a veces en pocas horas.<sup>8,40</sup>

Los pacientes que sufren de diabetes tipo 1 pueden mostrar los síntomas de la cetoacidosis, incluso después de iniciado el tratamiento con insulina, si se olvidan de una inyección o si sufren una infección, un accidente o una enfermedad grave.

La diabetes tipo 2 puede no causar ningún síntoma durante años o décadas. Cuando la deficiencia insulínica progresa, los síntomas empiezan a manifestarse. Al principio, el aumento de la micción y de la sed son moderados, aunque empeoran gradualmente con el transcurso del tiempo. Si la concentración de glucosa en sangre es muy elevada (superior a 1000 mg/dL), en general por el estrés provocado por una infección o un fármaco, se produce deshidratación grave, confusión mental, somnolencia, convulsiones y una afección denominada coma hiperglucémico hiperosmolar no cetósico.<sup>8,40</sup>

### **Complicaciones.**

A medida que el trastorno se desarrolla, las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre lesionan los vasos sanguíneos, los nervios y otras estructuras internas. Sustancias complejas derivadas del azúcar se acumulan en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, provocando su engrosamiento y ruptura. Este aumento de grosor es la causa de que los vasos sanguíneos aporten cada vez menos sangre, sobre todo a la piel y a los nervios. Los valores de azúcar poco controlados tienden también a aumentar las concentraciones de sustancias grasas en sangre, y, en consecuencia, se produce una arteriosclerosis acelerada (formación de placas en los vasos sanguíneos). La arteriosclerosis es de dos a seis veces más frecuente en los diabéticos que en los no diabéticos y se produce tanto en los varones como en las mujeres. La disminución de la circulación sanguínea, tanto por los vasos grandes como por los pequeños, puede provocar alteraciones fisiológicas en el corazón, el cerebro, las piernas, los ojos, los riñones, los nervios y la piel, demorando, además, la curación de las lesiones.<sup>9,40</sup>

Complicaciones de la diabetes a largo plazo

Tejido u órgano afectado	Qué sucede	Complicaciones
Vasos sanguíneos	Se forman placas ateroscleróticas y obstruyen las arterias grandes o medianas del corazón, cerebro, piernas y pene. Las paredes de los pequeños vasos sanguíneos se dañan en modo tal que los vasos no permiten el paso normal de oxígeno a los tejidos y además pueden romperse y perder sangre.	La escasa circulación causa heridas que sanan con dificultad y puede producir insuficiencia cardíaca, ictus, gangrena en los pies y las manos, impotencia e infecciones.
Ojos	Los pequeños vasos sanguíneos de la retina se dañan.	Visión disminuida y finalmente, ceguera.
Riñón	Los vasos sanguíneos del riñón se engrosan, las proteínas se pierden por la orina, la sangre no se filtra normalmente.	Funcionamiento renal deficiente; insuficiencia renal.
Nervios	Los nervios se dañan porque la glucosa no es metabolizada normalmente y porque el suministro de sangre es inadecuado.	Debilidad repentina o gradual de una pierna; sensibilidad reducida, hormigueo y dolor en las manos y en los pies, daño crónico a los nervios.
Sistema nervioso autónomo	Daño en los nervios que controlan la presión arterial y los procesos digestivos.	Oscilaciones en la presión arterial, dificultades en la deglución y alteraciones del funcionamiento gastrointestinal, con episodios de diarrea.
Piel	Mala circulación de la sangre a la piel y pérdida de la sensibilidad como resultado de lesiones repetidas.	Llagas, infecciones profundas (úlceras diabéticas); curación muy difícil.
Sangre	Se deteriora el funcionamiento de los glóbulos blancos.	Aumento de la propensión a las infecciones, especialmente del tracto urinario y de la piel.
Tejido conjuntivo	Metabolización anormal de la glucosa, haciendo que los tejidos se engrosen o contraigan.	Síndrome del túnel carpiano; contractura de Dupuytren.

Por todas estas razones, la diabetes implica la aparición de muchas complicaciones graves durante un tiempo prolongado. Los ataques al corazón y los accidentes vasculares cerebrales son muy frecuentes. Los daños a los vasos sanguíneos del ojo pueden provocar la pérdida de la visión (retinopatía diabética). La función que cumplen los riñones se altera y da como resultado una insuficiencia renal que requiere diálisis.

Las lesiones nerviosas se manifiestan de varias maneras. Si un solo nervio funciona mal (mononeuropatía), aparece una debilidad característica en un brazo o una pierna. Si se dañan los nervios de las manos, las piernas y los pies (polineuropatía diabética), puede aparecer una sensación anómala en forma de hormigueo o dolor ardiente, y debilidad en los brazos y las piernas. Los daños a los nervios de la piel predisponen a las lesiones repetidas, porque la persona pierde la sensibilidad para percibir los cambios de presión o temperatura. Un aporte escaso de sangre a la piel también provoca úlceras e influye en que todas las heridas sanen muy lentamente. Las úlceras del pie pueden volverse tan profundas e infectadas y resultar tan difícil su curación, que puede incluso ser necesaria la amputación de una parte de la pierna.<sup>9,40</sup>

Hay indicios recientes que demuestran que las complicaciones de la diabetes pueden evitarse, demorar o retrasar, mediante el control de los valores de azúcar en la sangre. Existen también otros factores desconocidos, incluyendo los genéticos, que determinan el curso de los acontecimientos.<sup>9,40</sup>

### **Diagnóstico de la diabetes.**

Los criterios para el diagnóstico de la diabetes mellitus han sido recientemente revisados por un grupo de expertos nombrados por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>1,32,41,45</sup>

Existen tres criterios distintos para diagnosticar la diabetes:

1. La presencia de síntomas clásicos (polidipsia, polifagia, poliuria y pérdida de peso), con el hallazgo casual, sin considerar el tiempo pasado desde la última comida, de un nivel de glucosa en sangre (glucemia) por encima de 200 mg/dL (11.1 mmol/L).
2. Una glucosa en ayunas superior a 126 mg/dL (7 mmol/L).
3. La presencia de unos niveles de glucosa por encima de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en un análisis de dos horas posterior a una sobrecarga oral de glucosa de 75 gramos (prueba realizada según los criterios de la OMS).

*El hallazgo aislado de cualquiera de estos criterios no es suficiente para establecer el diagnóstico. Debe confirmarse en días posteriores con el mismo, o alguno de los dos restantes.*

### **Diabetes Mellitus Tipo 1.**

Esta forma de diabetes es de mediación inmunitaria en más de 90% de los casos, e idiopática en menos de 10%. Este tipo de diabetes se relaciona generalmente con cetosis en los casos sin tratamiento. Se presenta con mayor frecuencia en personas jóvenes, con la frecuencia más alta en el grupo de edad de 10 a 14 años, aunque en ocasiones, se presenta en adultos, en especial no obesos, y en las personas que tienen edad avanzada cuando aparece por primera vez la hiperglucemia.<sup>8,12,14,24,32</sup>

Consiste en un trastorno catabólico en el cual no hay prácticamente insulina circulante, aumenta el glucagón plasmático y las células  $\beta$  pancreáticas fallan en la

respuesta a todos los estímulos insulinógenos. Por tanto, se requiere de insulina exógena para revertir el estado catabólico, prevenir la cetosis, disminuir la hiperglucagonemia y reducir la glucosa sanguínea.

La mayor frecuencia de diabetes tipo 1 mediada inmunitariamente, se encuentra en los países escandinavos, y el norte de Europa (Finlandia, Suecia, Noruega, Reino Unido, Francia), y la frecuencia más baja de diabetes tipo 1 se encuentra en China y algunas partes de América del Sur.<sup>24</sup>

Ciertos antígenos del sistema HLA se asocian fuertemente con el desarrollo de la diabetes tipo 1. Alrededor de 95% de los pacientes tipo 1 poseen HLA-DR3 o HLA-DR4. Los genes HLA-DQ son incluso marcadores más específicos de la susceptibilidad al tipo 1. Adicionalmente se han detectado anticuerpos circulantes contra la célula de los islotes en hasta 85% de los pacientes analizados en las primeras semanas de su diabetes. Debido a estas características inmunitarias, se considera que la diabetes tipo 1 es el resultado de una agresión ambiental infecciosa o tóxica a las células  $\beta$  pancreáticas en personas con predisposición genética.<sup>14,24</sup>

### ***Clasificación de la Diabetes Tipo 1:***

- ***Diabetes Mellitus Tipo 1 Mediada Inmunitariamente.***

Entre los factores extrínsecos que afectan a la función de la célula  $\beta$  se incluyen lesión producida por virus, como los virus de la parotiditis o coxsackie B4, por agentes químicos tóxicos o por citotoxinas destructivas y anticuerpos liberados por los inmunocitos sensibilizados. Un defecto genético subyacente en el cromosoma 6 relacionado con la replicación o función de la célula  $\beta$  puede predisponer a la aparición de una insuficiencia de dicha célula. Se cree que los genes HLA específicos de la respuesta inmunitaria predisponen a los pacientes a la respuesta autoinmunitaria destructora contra sus propias células de los islotes (autoagresión).<sup>7,8,21,24,45</sup>

- ***Diabetes Mellitus Tipo 1 Idiopática.***

Menos del 10% de los sujetos diabéticos no muestran evidencia de autoinmunidad contra las células  $\beta$  pancreáticas como explicación a su insulinopenia y cetoacidosis. Este subgrupo se clasifica como “diabetes tipo 1 idiopática” y se designa como “tipo 1B”. Aún cuando sólo una minoría de los pacientes con diabetes tipo 1 cae en este grupo, la mayoría son de origen asiático o africano.<sup>8,21,24</sup>

## **Diabetes Mellitus Tipo 2.**

Este tipo constituye un grupo heterogéneo que incluye a las variantes leves de la diabetes que se presentan de manera predominante en los adultos y en ocasiones en los jóvenes. La insulina endógena circulante es suficiente para evitar la cetoacidosis, pero inadecuada para evitar la hiperglucemia frente al incremento de las necesidades debido a la insensibilidad tisular<sup>6</sup>. La diabetes tipo 2 se define en términos básicamente negativos, es decir: es una forma no cetósica de diabetes que no está vinculada a los marcadores HLA en el sexto cromosoma; no produce anticuerpos contra las células de los islotes, y no depende de tratamiento insulínico exógeno para mantener la vida del paciente, por lo que se denomina “diabetes mellitus no dependiente de la insulina”.<sup>7,8,21,24,45</sup>

En la mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes, cualquiera que sea su peso corporal, ya que se divide en dos subgrupos de acuerdo a la presencia o ausencia de obesidad, se ha observado insensibilidad de los tejidos a la insulina, y se ha atribuido a diversos factores interrelacionados. Éstos incluyen un presunto (y hasta el momento indefinido) factor genético, el cual se agrava con el tiempo por reforzadores de la resistencia a la insulina como el envejecimiento, una vida sedentaria, y la obesidad abdominal-visceral. Adicionalmente, hay una deficiencia concomitante en la respuesta de las células  $\beta$  pancreáticas a la glucosa.<sup>8,24,45</sup>

La mayor parte de los datos epidemiológicos indican fuertes influencias genéticas, ya que en los gemelos homocigotos mayores de 40 años de edad se produce concordancia en más de un 70%.<sup>24</sup>

Hasta el momento los intentos por identificar un marcador genético para la diabetes tipo 2 no han tenido éxito, aunque se ha reportado un enlace con un gen en el cromosoma 2 que codifica una proteasa de cisteína llamada calpaina 10 que ha sido encontrada en una población mexicano-estadounidense.<sup>24</sup>

Además, la demostración de que el gen de la insulina humana se encuentra en el cromosoma 11 hace pensar en que dicho cromosoma contiene los factores que determinan la síntesis apropiada de insulina y podría afectar a su almacenamiento y liberación.

### Otros Tipos Específicos de Diabetes Mellitus.

- Diabetes juvenil de inicio en la madurez (del inglés, *maturity-onset diabetes of young* [MODY]): este subgrupo consiste en un trastorno monogenético relativamente raro, caracterizado por una diabetes no dependiente de insulina, con herencia autosómica dominante y una edad al momento del inicio de 25 años o menor. Los pacientes no son obesos y en ellos la hiperglucemia se debe a un deterioro en la secreción de la insulina inducida por la glucosa. Se han descrito 5 tipos de MODY (MODY 1, 2, 3, 4 y 5) con defectos de gen simple localizados en los cromosomas 20, 7, 12, 13 y 17, respectivamente.
- Diabetes debida a insulinas mutantes.
- Diabetes debida a receptores mutantes de la insulina.
- Diabetes mellitus asociada con una mutación del DNA mitocondrial.

**Cuadro2.** Clasificación de diabetes mellitus según la ADA y la OMS.<sup>11,32,50</sup>

i. Diabetes tipo 1 <sup>2</sup> (destrucción de la célula B, por lo general da origen a la deficiencia absoluta de insulina)	E. Inducida por fármacos o sustancias químicas
A. Mediada inmunitariamente	1. Vacor
B. Idiopática	2. Pentamidina
II. Diabetes tipo 2 <sup>2</sup> (puede variar desde predominio de resistencia a la insulina con insuficiencia relativa a la insulina hasta un defecto predominantemente secretor con resistencia a la insulina)	3. Ácido nicotínico
III. Otros tipos específicos	4. Glucocorticoides
A. Diabetes tipo 1 <sup>2</sup> (destrucción de la célula B)	5. Hormona tiroidea
	6. Diazóxido
	7. Agonistas β adrenérgicos
	8. Triacidas
	9. Fenitión



## **CAPITULO 4.**

### **Tratamiento para la Diabetes Mellitus.**

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que requiere cuidados médicos y educación constante para evitar enfermedades agudas y reducir el peligro de complicaciones a largo plazo. La terapéutica dirigida hacia estas metas no debe restringir demasiado la calidad de vida del paciente.<sup>11,18,32</sup>

No se sabe aún si el tratamiento de la hiperglucemia asintomática reduce la morbilidad y mortalidad, y hay un riesgo importante de hipoglucemia en los enfermos de edad avanzada a quienes se administran agentes hipoglucémicos bucales o terapéutica de insulina.<sup>13,19,26</sup>

Los resultados del estudio de control y complicaciones de diabetes indican que el objetivo terapéutico consiste en restaurar hacia la normalidad desarreglos metabólicos conocidos con el propósito de evitar y demorar la progresión de las complicaciones diabéticas. Este objetivo debe mantenerse cuando se hace todo esfuerzo posible para evitar una hipoglucemia intensa.<sup>13,19,26</sup>

Clásicamente se han considerado tres pilares fundamentales en el tratamiento de la diabetes mellitus: I) tratamiento no farmacológico: dieta, ejercicio; II) tratamiento farmacológico: hipoglucemiantes, insulina; III) otros tipos de terapia.

#### **I. Tratamiento No Farmacológico:**

##### ***a) Dieta.***

La dieta nutritiva, bien balanceada es aún el elemento fundamental del tratamiento. Sin embargo, en más de la mitad de los casos los diabéticos no la siguen. Al prescribir una dieta, es importante relacionar los objetivos dietéticos con el tipo de diabetes y el peso del paciente. Las siguientes recomendaciones han sido revisadas por la ADA.<sup>13,26</sup>

- a) Carbohidratos: Es necesario recordar que la cantidad mínima de carbohidratos por día, necesaria para evitar la cetosis, es de 100g, y que la dosis habitual en los

diabéticos debe oscilar entre los 150 y 300g al día, es preferible el consumo de polisacáridos y carbohidratos que contengan 20 a 35g de fibra dietética.

Lo ideal, es conservar o aproximarse al peso teórico, aumentando o disminuyendo las calorías según la tendencia del peso del paciente.

- b) Proteínas: Las cantidades diarias recomendadas (CDR) son de 0.8g/kg corporal/día.
- c) Lípidos: Menos del 10% de las calorías deben proceder de grasas no saturadas. El consumo de colesterol debe reducirse hasta 200-300mg al día.
- d) Fibra Dietética: La ADA recomienda alimentos del tipo de la avena, cereales y frijoles.
- e) Sal: Se deberá limitar su ingesta a 3mg/día en sujetos con hipertensión y 6g/día en sujetos normotensos.
- f) Edulcorantes artificiales: El aspartame (Natural Sweet) es popular para pacientes diabéticos está constituido por dos aminoácidos (ácido aspártico y fenilalanina) que se combinan para producir un edulcorante que es 180 veces más dulce que la sacarina.
- g) Bebidas alcohólicas: El consumo de alcohol por personas diabéticas, puede causar hipoglucemia; asimismo, puede afectar la capacidad de recuperación de la hipoglucemia al inhibir la gluconeogénesis hepática.

#### ***b) Ejercicio Físico:***

Al igual que ocurre con la dieta, el ejercicio físico adecuado constituye un aspecto fundamental del tratamiento de la diabetes mellitus. Entre las ventajas asociadas a su práctica regular cabe destacar, que: ayuda a conseguir un mejor control metabólico disminuyendo las concentraciones de glucosa; aumenta la sensibilidad a la insulina; permite reducir el peso; reduce los factores de riesgo cardiovascular al mejorar el perfil lipídico y la presión arterial; aumenta la fuerza y flexibilidad y mejora la sensación de bienestar y la calidad de vida del sujeto; es importante que el paciente al realizar ejercicio siempre esté bien hidratado ya que la deshidratación se asocia con los niveles de glucosa y la función cardiaca.<sup>13,26</sup>

## **II. Tratamiento Farmacológico:**

En aquellos pacientes que tras un periodo de tres meses de tratamiento dietético, de práctica de ejercicio físico y educación sobre su enfermedad no se observa una mejoría razonable en su glucemia, de acuerdo con los objetivos individuales establecidos, deberá incorporarse el uso de fármacos, a su plan de tratamiento.

Los fármacos deben ser utilizados como medio para aumentar los efectos de la dieta y del ejercicio físico, y no como medio para reemplazarlos.

El tratamiento con antidiabéticos orales sólo se muestra eficaz mientras que las células  $\beta$  pancreáticas mantienen cierta capacidad secretoria de insulina; como consecuencia de esta disminución en la capacidad de secretar insulina, que forma parte de la progresión natural de la enfermedad, puede ocurrir, que con el tratamiento farmacológico con el que se ha conseguido un excelente control de la glucemia, con el tiempo puede ser inadecuado.<sup>28,31</sup>

***c) Hipoglucemiantes orales.***

Los hipoglucemiantes orales son un conjunto heterogéneo de fármacos que se caracterizan por producir una disminución de los niveles de glucemia luego de su administración por vía oral, cumpliendo con este propósito a través de mecanismos pancreáticos y/o extrapancreáticos.<sup>5,28,31</sup>

***Grupos Farmacológicos.***

Los hipoglucemiantes orales abarcan cuatro familias de fármacos bien definidos:

- 1) Sulfonilureas.
- 2) Biguanidas.
- 3) Inhibidores de las  $\alpha$  – glucosidasas.
- 4) Tiazolidinedionas.

1) *Sulfonilureas*:

Esta familia de fármacos puede ser subdividida de acuerdo a su vida media ( $t_{1/2}$ ) en tres grupos los cuales se representan en el cuadro 3.

**Cuadro3.** Clasificación de las sulfonilureas.<sup>31</sup>

De duración corta
§ Glibenclamida (fármaco prototipo) § Tolbutamida § Glipizida § Gliquidona § Gliciclamida
De duración intermedia
§ Glicazida (fármaco prototipo) § Acetohexamida § Glibormurida
De duración prolongada
§ Cloropropamida

El mecanismo de acción de estos fármacos comprende efectos pancreáticos y extrapancreáticos.<sup>31</sup>

Los primeros incluyen un aumento de la estimulación a las células  $\beta$  del páncreas para la liberación de insulina, este efecto se produce por un bloqueo de la bomba K-ATPasa lo que se traduce en una despolarización prolongada de la membrana celular, con el consiguiente ingreso del calcio extracelular provocando la liberación de la insulina de los gránulos secretorios hacia el torrente sanguíneo<sup>28</sup>. Al comienzo del tratamiento los niveles de insulina en sangre se elevan y la glucemia desciende, en tanto que con la administración crónica de sulfonilureas, los valores de insulina disminuyen hasta cifras pre-tratamiento, y se conservan valores reducidos de glucosa en plasma, el mecanismo íntimo de este proceso se desconoce en la actualidad, pero se supone que se debe a un aumento de la sensibilidad de los tejidos diana a la acción de la insulina, debido a la normalización de la glucemia y al predominio de los efectos extrapancreáticos.<sup>13,26</sup>

Los efectos extrapancreáticos comprenden fundamentalmente un aumento de los receptores de insulina en monocitos, eritrocitos y adipocitos (Olefsky y Reaven, 1976);

aumentan el efecto de la insulina y el número de transportadores para dicha hormona (Jacobs y col., 1989); producen inhibición de la gluconeogénesis hepática (Blumenthal, 1977) y aumento del consumo de glucosa a nivel periférico.<sup>31</sup>

La vía de administración es la oral. La absorción de todas, excepto glimepirida se altera con la presencia de alimentos en el tubo digestivo por lo cual se recomienda, para las de acción corta, la administración del fármaco 30 minutos antes de las comidas<sup>27</sup>. Las sulfonilureas circulan unidas en forma variable (70-99%) a proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina<sup>27</sup>. El metabolismo es fundamentalmente hepático, excepto la cloropropamida que se metaboliza escasamente (menos del 1%); la excreción es fundamentalmente renal, excepto la gliquidona que se elimina por vía biliar.<sup>31</sup>

**Cuadro4.** Principales parámetros farmacocinéticos de las sulfonilureas<sup>31</sup>

	Concentración Max (hr)	t ½ (hr)	% unión a prot. plasm.
<b>Glibenclamida</b>	1 – 2	1.5 - 3	99
<b>Glipizida</b>	1.5	1 - 5	98
<b>Tolbutamida</b>	3 – 4	3.2	96
<b>Glicazida</b>	2 – 8	6 - 15	90
<b>Glibornurida</b>	2 – 4	5 - 12	95
<b>Gliquidona</b>	2 – 3	10 - 20	99
<b>Acetohexamida</b>	1 – 5	2 - 8	75
<b>Cloropropamida</b>	2 – 8	30 - 48	70

Los efectos adversos de estos fármacos son poco frecuentes (menos del 4%)<sup>27</sup>. De todos ellos el más severo es la hipoglucemia (mortalidad 10%), que se presenta mas frecuentemente en los ancianos, pacientes con insuficiencia renal o hepática o en aquellos tratados con cloropropamida. Este efecto también puede ser desencadenado por falta de ingesta, sobredosis, historia de insuficiencia renal o ejercicios intensos.

Las sulfonilureas pueden producir además trastornos gastrointestinales (nauseas, vómitos, diarreas), reacciones hematológicas (agranulocitosis, anemia aplásica, aplasia medular, anemia hemolítica y púrpura trombocitopénica), trastornos hepáticos, reacciones disulfirámicas (mas frecuentemente con cloropropamida), efectos teratogénicos (por atravesar fácilmente la barrera placentaria), por último, producen hiponatremia al potenciar los efectos de la hormona antidiurética.<sup>13,26</sup>

El estudio multicéntrico UGDP (University Group Diabetes Program) sugirió que el tratamiento con sulfonilureas se relacionaba con un aumento de la morbi-mortalidad cardiovascular por infarto agudo de miocardio<sup>2</sup>, pero actualmente el estudio UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study Group) no ha demostrado que el tratamiento con clorpropamida y glibenclamida aumenten la morbi-mortalidad cardiovascular.<sup>31</sup>

La principal indicación de la sulfonilureas la constituyen los pacientes diabéticos no insulino-dependiente (DMNID) que no respondan al tratamiento dietético. Las contraindicaciones son diabetes insulino-dependiente, acidosis y/o coma diabético, infecciones graves, cirugía mayor, adelgazamiento, diabetes secundaria a pancreatomelectomía, embarazo, lactancia, insuficiencia renal, insuficiencia hepática<sup>13,26,31</sup>

## 2) *Biguanidas*

Dentro de esta familia de fármacos, se encuentra los agentes fenformina, buformina (ambas retiradas del mercado farmacéutico por sus graves efectos adversos) y metformina. El mecanismo de acción fundamental es la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el incremento de la glucólisis anaeróbica, con la consiguiente elevación de alanina, glicerol y ácido láctico. Otro mecanismo implicado es la disminución de la absorción intestinal de glucosa.<sup>31</sup>

Dentro de los efectos adversos los más frecuentes son de tipo gastrointestinal (20 % de los pacientes), estos incluyen diarreas (30%), náuseas, vómitos, anorexia y sabor metálico. El efecto adverso de mayor riesgo es la acidosis láctica, que alcanza una mortalidad de hasta el 50 %, con una incidencia menor al 0.1/1000 pacientes/año.<sup>13,19,26</sup>

Las principales interacciones farmacológicas se presentan con la cimetidina y con el alcohol. En el primer caso se produce una competencia con la excreción renal, por lo que aumenta la concentración de metformina y debe ajustarse la dosis. En el segundo caso se potencia el efecto hiperlactacémico por lo cual debe evitarse la administración conjunta. Su principal indicación la constituyen los pacientes con DMNID y obesidad, que no

responden a la dieta ni al ejercicio físico. Se las puede utilizar sola o combinada con sulfonilureas o insulina.<sup>13,19,26,28.</sup>

Las contraindicaciones son similares a las de las sulfonilureas, pero se agregan enfermedad cardiovascular grave, úlcera gastro-duodenal, deficiencia de vitamina B12, hierro y ácido fólico.<sup>13,19,26,28</sup>

### 3) *Inhibidores de las $\alpha$ - glucosidasas:*

Dentro de este grupo se encuentran el miglitol y la acarbosa<sup>5</sup>. El mecanismo de acción fundamental es la inhibición reversible y competitiva de las  $\alpha$  - glucosidasas en el borde en cepillo de la mucosa intestinal, produciendo el retraso en la absorción de los carbohidratos complejos, con la consiguiente reducción del pico máximo de glucemia postprandial.

Su utilización es más eficaz cuando se realiza conjuntamente a una dieta rica en fibras y reducido en glucosa y sacarosa.<sup>13,19</sup>

Los efectos adversos más frecuentes incluyen malabsorción, flatulencia, meteorismo (21-32%), cuando se administra como monofármaco no se presenta hipoglucemia.<sup>19,26</sup>

Constituyen contraindicaciones para su utilización las enfermedades intestinales crónicas, el embarazo, lactancia, cirrosis hepática, insuficiencia renal con niveles de creatinina superiores a 2 mg/dL.

Su principal indicación la constituyen pacientes con DMNID con valores de glucemia basales entre 140-180 mg/dL y glucemias postprandiales elevadas (entre 180-250 mg/dL), o aquellos casos en que exista contraindicación para el uso de sulfonilureas o metformina.<sup>28</sup>

### 4) *Tiazolidinedionas*

Dentro de este grupo se encuentran la troglitazona, la pioglitazona y la ciglitazona, la primera fue retirada del mercado por sus efectos hepatotóxicos<sup>13,19,26</sup>

El mecanismo de acción de estos fármacos se lleva a cabo mediante la unión al subtipo g del receptor nuclear de proliferación activado por peroxisomas (PPARg), produciendo de esta manera un aumento en la transcripción de genes de las enzimas que normalmente son inducidas por la insulina, esta acción se lleva a cabo fundamentalmente en el tejido muscular y graso, todo esto se traduce en un aumento de la utilización periférica de glucosa.<sup>18,19</sup> Otro mecanismo descrito es la inhibición de la gluconeogénesis hepática.<sup>19</sup>

La vía de administración es oral, circulan unidas a proteínas principalmente (99%) albúmina plasmática y se metabolizan por conjugación en sulfoconjugados, ácido glucurónico y quinonas. Se excreta fundamentalmente por vía biliar, por lo cual no se altera con la insuficiencia renal.<sup>19</sup>

Se asocia la troglitazona con daño hepatocelular leve en un 2%, otros efectos adversos son las molestias gastrointestinales, reducción ligera de los niveles de hemoglobina, cardiomegalia sin hipertrofia del ventrículo izquierdo.<sup>18,19</sup>

Su principal indicación son los pacientes con DMNID con predominio de resistencia a la insulina, especialmente cuando existe intolerancia o contraindicación para el uso de metformina.<sup>18,19</sup>

### ***Seguridad de los hipoglucemiantes orales.***

El programa UGDP (*University Group Diabetes Program*) publicó que la mortalidad por afección cardiovascular en diabéticos tratados con tolbutamida o fenformina, que en la actualidad casi no se usa, fue excesiva comparada con los que recibieron insulina o placebo. Es por eso, que en la actualidad los empaques de sulfonilureas y metformina incluyen una etiqueta de advertencia respecto del potencial de muerte de origen cardiaco.<sup>14,45</sup>

### ***d) Insulina.***

Actualmente, la mayoría de los pacientes son tratados con inyecciones subcutáneas de preparaciones de insulina. La insulina comercial proviene de la extraída del páncreas de buey o del cerdo y en la actualidad se cuenta con insulina humana obtenida mediante la biosíntesis con DNA o por conversión enzimática de la insulina porcina a la de la estructura de la insulina humana. No obstante, no ha sido posible reproducir los patrones fisiológicos de secreción de insulina con las inyecciones subcutáneas de suspensiones de insulina soluble o de acción prolongada. Aún así, con la ayuda de modificaciones apropiadas de la dieta y el ejercicio así como la vigilancia cuidadosa de las concentraciones de glucosa, se ha podido lograr un control aceptable de la glucosa sanguínea mediante el uso de mezclas variables de insulina de acción breve y prolongada inyectadas por lo menos dos veces al día.<sup>2,14,18,32,45</sup>

La insulina está indicada para diabéticos tipo 1 (DMID) y para los no obesos tipo 2 con insulinopenia cuya hiperglucemia no responde a la dietoterapia sola o combinada con hipoglucemiantes orales así como para las personas en las cuales la enfermedad ha empezado antes de alcanzar la edad adulta, en la mayoría de las personas desnutridas y en mujeres embarazadas.<sup>14,18,32,45</sup>

- ***Tipos de Insulina.***

A. Insulinas de acción rápida.

- a) Insulina regular o normal, también llamada insulina cristalina zinc (ICZ).
- b) Insulina semilenta o insulina zinc amorfa.

B. Insulinas de larga duración. Son insulinas modificadas fundamentalmente por protaminas, en buffer de acetato.

- a) Insulina protamina zinc (IPZ).
- b) Insulina ultralenta.

C. Insulinas de acción intermedia.

- a) Insulina lenta.
- b) Insulina NPH (*Neutral-Protamin-Hagedorm*).
- c) Insulina globina.

***Control y complicaciones del tratamiento insulínico.***

El ensayo realizado por el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ha mostrado que con la terapia intensiva con insulina (tres o más inyecciones diarias) puede retrasar el inicio y la progresión de la retinopatía, nefropatía y neuropatía en pacientes diabéticos (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Sin embargo, esta clase de tratamiento no se puede llevar a cabo en todos los pacientes diabéticos, siendo desaconsejable tanto en niños como en ancianos. Además, pacientes bajo este tratamiento intensivo con insulina presentan un elevado riesgo de hipoglucemia.<sup>28,42</sup>

No existe un patrón fijo para la dosificación ni pautas de administración rígidas. Es necesario un control clínico y analítico hasta alcanzar la dosis de insulina conveniente y el ritmo de administración.<sup>14,18,20,42</sup>

En cuanto a las complicaciones con el tratamiento con insulina, puede haber reacciones secundarias como son: lipodistrofia, una reacción alérgica local, infecciones, calcificación cutánea y las más frecuentes que son la hipoglucemia iatrogénica, la alergia insulínica y las resistencias al efecto de la mediación.<sup>14,18,45</sup>

### III. Otros tipos de terapia.

#### 1. *Bombas de Insulina.*

Una alternativa que cada vez es más utilizada, consiste en la implantación de bombas de insulina subcutáneas. Estas bombas liberan de forma continua unos niveles basales de insulina en una tasa constante. Actualmente, se están desarrollando bombas de insulina de “ciclo cerrado” (closed loop) que llevan un sensor electrónico de glucosa que permite autoajustar la dosis constantemente haciéndolo compatible a cualquier tipo de dieta, ejercicio y estilo de vida que lleve el paciente.<sup>18</sup>

#### 2. *Transplantes.*

El trasplante de páncreas, elimina la necesidad de inyectar insulina al paciente. La calidad de vida de los pacientes transplantados está claramente mejorada. Sin embargo, los transplantes requieren inmunosupresión crónica, y los donantes son muy limitados. (Remuzzi y col., 1994; Landgraf, 1996). El trasplante de islotes

tiene las mismas desventajas y adicionalmente presenta un índice de supervivencia de sólo el 20%.<sup>12,18</sup>

### **3. *Incremento de la Captación de Glucosa.***

Se han diseñado diversos modelos animales a fin de estudiar que combinación de genes permitiría incrementar la captación de glucosa por hígado, músculo y demás tejidos periféricos. Esto podría ser una buena aproximación para reducir la hiperglucemia diabética y por tanto, para desarrollar aproximaciones de terapia génica para la diabetes.<sup>18</sup>

### **4. *Terapia Génica.***

Mediante la terapia génica se podría corregir una función anormal o la pérdida de la funcionalidad celular causada por la presencia de un gen mutado a través de la introducción del gen normal. Sin embargo a diferencia de otras enfermedades genéticas, en la diabetes aún no se localizan todos los genes alterados.<sup>18</sup>

### **5. *Terapia Celular.***

Gran número de aproximaciones se han centrado en manipular genéticamente células para que produzcan insulina de manera regulada fisiológicamente. Actualmente, diversos grupos están utilizando dos abordajes, que incluyen por un lado manipular genéticamente líneas celulares derivadas de insulinomas, y por otro, manipular células no pancreáticas para que produzcan insulina.

Aunque se han encontrado con varios inconvenientes, por ejemplo, estas líneas celulares presentan inestabilidad fenotípica, desdiferenciación y manifiestan tendencia a la secreción de insulina en respuesta a concentraciones subfisiológicas de glucosa, entre otras.<sup>18</sup>

### **6. *Regeneración de Islotes.***

La generación de nuevas células  $\beta$  en el páncreas de un individuo adulto puede parecer imposible. Sin embargo, un concepto biológico básico, muchas veces ignorado es que los islotes como todas las células tienen un tiempo de vida finito, con lo cuál es de esperar que haya un recambio. Durante la vida del individuo esta regulación depende en forma directa del correcto balance de la masa de células  $\beta$ . Los mecanismo a través de los cuáles se mantiene este delicado equilibrio se traduce en, replicación de células  $\beta$  preexistentes, neogénesis de células  $\beta$  y muerte celular

programada o apoptosis de las células que hayan cumplido su ciclo de vida. Tales cambios ocurren a lo largo de toda la vida del individuo, con el desarrollo, el crecimiento, el envejecimiento, así como también durante la gestación, la obesidad y otros cambios que incrementan la demanda funcional del islote.<sup>18</sup>

a) Neogénesis de células  $\beta$  pancreáticas.

Se denomina nesidioblastosis, al proceso definido morfológicamente como la neogénesis de células endocrinas que se originan por diferenciación de las células epiteliales de los conductos (Pictet R. y col., 1972; Cantenys D., 1981). Durante la vida fetal, cerca de un 80% de células que se generan lo hacen mediante diferenciación de células endoteliales. Después del nacimiento, se ha postulado que la replicación es el principio medio de expansión de las células  $\beta$  diferenciadas.<sup>18</sup>

En la vida adulta, las células  $\beta$  están altamente diferenciadas. A pesar de ello, en el adulto, el epitelio de conductos pancreáticos puede ser estimulado para inducir neogénesis. Un incremento en la tasa de neogénesis se ha conseguido en varios modelos experimentales. Estos modelos incluyen: ratas parcialmente pancreatectomizadas (Bonner-Weir y col., 1993); ratas pancreatectomizadas tratadas con un inhibidor de la cintaza de poli-ADP-ribosa (Terazono K. y col., 1988), y otros donde los nuevos islotes crecen de forma ectópica en los conductos. Así, la neogénesis de islotes es quizás un intento del organismo para compensar la pérdida de células  $\beta$  que está sufriendo, pero por alguna razón desconocida, este proceso fracasa y se detiene.<sup>18</sup>

b) Replicación de células  $\beta$  pancreáticas.

Respecto al mecanismo de replicación, algunos autores piensan que es el medio de expansión después del nacimiento, pero con una capacidad que disminuye con la edad (Hellerstrom C., 1988; Sweeney I., 1992). Como los islotes adultos muestran muy pocas células mitóticas, comúnmente se han considerado que no son capaces de crecer. Sin embargo, en algunos modelos *in vitro* e *in vivo* con islotes de ratones neonatos y adultos se ha demostrado lo contrario, encontrándose que unos y otros responden de manera similar a la mayoría de los estímulos, como: la glucosa, miembros de la familia de la hormona de

crecimiento (GH), y varios factores de crecimiento, factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); en algunos casos se ha observado crecimiento en replicación, en otros el aumento en volumen de los islotes y en otros se han observado ambos.<sup>18</sup>

c) Apoptosis y supervivencia de las células  $\beta$  pancreáticas.

El término apoptosis ha sido utilizado como muerte celular individual, tanto si está dirigida por factores internos como externos. La apoptosis está controlada por controlada por diferentes vías de señalización que convergen en una única vía final (Steller H. y col., 1995). Las señales que inducen apoptosis son muy variadas y en muchos casos las misma señales pueden inducir también diferenciación y proliferación (Hale AJ, 1996). Las vías implicadas en el proceso apoptótico son las siguientes:

- a. El sistema FAS (también conocido como APO-1 o CD95).
- b. La vía de las proteína/tirosina quinasas.
- c. La vía de las serina/treonina quinasas.
- d. La vía de Ras.
- e. La vía de la proteína quinasa C (PKC).
- f. La señalización del calcio.
- g. La vía de las ceramidas.
- h. La acción de los radicales libres.

Diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* han planteado la posibilidad de inhibir la apoptosis de las células  $\beta$  mediante la modulación de las vías más importantes.<sup>18</sup>

## II. JUSTIFICACIÓN.

La regeneración de células  $\beta$  a partir de células precursoras de los islotes podría curar la enfermedad. Sin embargo, para ello se requiere identificar factores que induzcan la replicación y neogénesis de células  $\beta$ , y que eviten la destrucción autoinmune de los nuevos islotes recién formados. Las células de los islotes son remplazadas constantemente mediante un recambio lento probablemente a partir de unas pocas células que mantiene la capacidad replicativa. Además, las estructuras de los ductos en el páncreas adulto contienen células pluripotenciales (stem) que pueden diferenciar a células endocrinas y generar nuevos islotes. Se han descrito varios factores de crecimiento que inducen la replicación de islotes fetales y neonatales *in vitro*, o bien, que son mitogénicos para las células epiteliales de los ductos.

Existen afirmaciones recientes de los efectos preventivos del buen control metabólico en la aparición y velocidad de progresión de las complicaciones crónicas asociadas con la diabetes.

Los factores que se han identificado como determinantes en el control glucémico son: la dieta, la actividad física, el acceso a los servicios de salud, la adherencia al tratamiento y la educación al paciente con diabetes.

Se debe tener presente que la propuesta de los organismos internacionales sobre el tratamiento de la diabetes tipo 2 se basa principalmente en la modificación de la dieta, la reducción y prevención de la obesidad, una actividad física acorde con la edad, sexo y ocupación, y en caso necesario, el empleo de hipoglucemiantes orales y de insulina. Todos estos factores han sido asociados con el control metabólico del paciente con diabetes.

Se tiene conocimiento por publicaciones aparecidas del efecto que tiene los medicamentos hipoglucemiantes orales en uso y otros muchos en fase de experimentación, reportándose una eficacia que va desde un 25 hasta un 70%, y que esa eficacia se ve disminuida por el tiempo de evolución de la enfermedad, la presencia de complicaciones, la edad del paciente y las características propias del medicamento.

A pesar de presentar esa eficacia los hipoglucemiantes orales, existen múltiples estudios que nos hablan del incremento de la enfermedad, así como de las complicaciones que secundariamente se presentan, lo que ha instado a los investigadores a realizar estudios realizando combinaciones de medicamentos para incrementar el grado de eficacia.

La diabetes mellitus es una enfermedad que afecta a la población mundial siendo una de las causas principales de mortalidad.

En México, constituye un grave problema de salud pública asociado con altas tasas de mortalidad y ocasionando complicaciones crónicas que deterioran la calidad y el tiempo de vida de aquellas personas que la padecen.

Esta enfermedad es la principal causa de demanda de consulta externa en instituciones públicas y privadas, representando grandes gastos en programas de salud pública.

Los estudios sobre la prevalencia en México son escasos, y es difícil hacer comparaciones entre los existentes, ya que difieren en las técnicas empleadas para su diagnóstico, así como en el tiempo que transcurre entre la realización de un estudio y otro, además, la información disponible en México sobre la situación epidemiológica de la diabetes mellitus es aún incompleta.<sup>1,17,43</sup>

El tratamiento empleado para la diabetes mellitus a base de hipoglucemiantes orales así como la utilización de insulina han dado buenos resultados en el control del padecimiento aunque se siguen encontrando casos en los cuales existe la presencia de diversos problemas en los cuales el tratamiento llega a ser una carga desagradable, problemas tales como: la presencia de efectos secundarios, la intolerancia a la agujas, y el costo del tratamiento, entre otros; por lo que, es necesario la innovación de nuevos fármacos que brinden a los pacientes mejores resultados sin tener que invertir grandes cantidades de dinero para su salud. Además de continuar con las investigaciones hasta lograr el objetivo deseado que es el descubrimiento de una cura para la diabetes mellitus.

De esta forma, el propósito de este trabajo es la realización de un bioensayo con el fin de evaluar el efecto hipoglucemiante y regenerador de células  $\beta$  pancreáticas en ratas Wistar sanas manifestado por la administración del compuesto Thelzán 101, del cuál estudios no documentados han demostrado dicho comportamiento y al tener la característica de fitofármaco, los costos de tratamiento son menores que los del tratamiento convencional, de esta forma, proponer el compuesto Thelzán 101 como una alternativa en el tratamiento de la diabetes.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **Objetivo General.**

- Evaluar el efecto hipoglucemiante producido por el compuesto Thelzán 101 mediante la determinación de glucosa así como el efecto citotóxico producido en hepatocitos y su capacidad regeneradora de células  $\beta$  pancreáticas en ratas wistar macho.

#### **Objetivos Particulares.**

- Determinar la dosis letal media del compuesto Thelzán 101 en ratas wistar macho.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante del compuesto Thelzán 101 mediante la determinación de glucosa en sangre en ratas wistar macho.
- Evaluar el efecto citotóxico provocado por el compuesto Thelzán 101 en hepatocitos.
- Evaluar la capacidad regeneradora de células  $\beta$  pancreáticas en ratas wistar macho producida por el compuesto Thelzán 101 mediante la utilización de tinciones específicas y a nivel ultraestructural.
- Evaluar el peso de las ratas wistar durante toda la investigación para observar la relación existente entre la administración del compuesto Thelzán 101 y la masa corporal de los animales.

### **IV. HIPÓTESIS.**

Se espera que con la administración del compuesto Thelzán 101, los niveles de glucosa en sangre de las ratas disminuyan y se observen signos de regeneración en células  $\beta$  pancreáticas mientras que en hepatocitos se espera que no provoque lesiones.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se emplearon 24 ratas macho de la línea isogénica Wistar con peso corporal entre 180 a 210g, procedentes de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, se mantuvieron a una temperatura de 20-25°C y fueron alimentadas con Purina Standard Chow.

A todas las ratas se les realizó un pesaje inicial y se distribuyeron en dos lotes de doce ratas cada uno. Posteriormente fueron pesadas los días lunes y viernes de cada semana durante el lapso de tiempo que duró la investigación, esto con el fin de determinar como influía la administración de Thelzán 101 en el peso corporal de los animales, además para obtener el volumen requerido en la administrar del compuesto.

El compuesto Thelzán 101 fue proporcionado por los laboratorios Thelzán de México S.A de C.V.

A todas las ratas se les realizó una determinación de glucosa en muestra sanguínea, obteniendo sangre cardiaca, esto con el fin de obtener datos de glucosa basal de todos los animales normoglicémicos. Posteriormente, después de la administración de Thelzán 101, las muestras fueron tomadas una vez por semana hasta el sacrificio de los animales.

### ➤ *Determinación de los niveles de glucosa en rata.*

Se utilizó el método de la glucosa oxidasa (kit Erlic Mexicana S.A de C.V), que se fundamenta en la oxidación enzimática de la glucosa catalizada por la glucosa oxidasa. Durante esta reacción, mediada por peroxidasa, se produce peróxido de hidrógeno que reacciona con el fenol y la 4-aminofenazona, originando una quinoneimina. El complejo rojo formado se leyó en un espectrofotómetro Spectronic 20D+ a una longitud de onda de 546nm.

El análisis se realizó en 3 etapas:

➤ *Evaluación farmacológica del efecto hipoglucemiante de Thelzán 101.*

### ***Etapa 1.***

Para esta primera etapa, el método se basa en 2 aspectos:

1. Una investigación inicial que establece el intervalo de dosis que producen efectos tóxicos.
2. Basados en los resultados anteriores, otras dosis específicas son administradas para calcular una DL50.

Con el paso 1, los resultados muestran si la sustancia es muy tóxica, menos tóxica o solamente débilmente tóxica y para eso se utilizó uno de los lotes de 12 ratas wistar macho las cuáles fueron distribuidas en cuatro lotes de 3 ratas cada uno; el primer lote fue empleado como lote control al cual sólo se administró solución salina fisiológica (SSF); el siguiente grupo constituye el lote 2 al cual se le administró el compuesto Thelzán 101 a una dosis de 10mg/kg; al lote 3 se le administró el compuesto Thelzán 101 a una dosis de 100mg/kg; y finalmente, al lote 4 se le administró el compuesto Thelzán 101 a una dosis de 1000mg/kg; en todos los lotes la administración se realizó vía Intraperitoneal.

Una hora después de la administración del compuesto Thelzán 101, se midieron los niveles de glucosa en sangre de cada uno de los animales de los 4 lotes, y se realizó una comparación de los niveles de glucosa en estado basal y después de la administración del compuesto Thelzán 101.

De acuerdo a la cantidad de animales fallecidos en la etapa anterior, se recurrió al siguiente cuadro de sobrevivencia-mortalidad para obtener las dosis requeridas para la etapa 2 en el cálculo de la dosis letal 50 del compuesto Thelzán 101.

## ***Etapa 2.***

Para la segunda etapa, se empleó el otro lote de 12 ratas wistar macho las cuáles fueron distribuidas en cuatro lotes de tres ratas cada uno a diferentes dosis del compuesto Thelzán 101, estas dosis fueron establecidas de acuerdo a los resultados obtenidos de sobrevivencia-mortalidad de la etapa 1 como se muestra en el cuadro anterior. Las dosis empleadas fueron las siguientes: para el lote 1, una dosis de 20mg/kg; para el lote 2, se utilizó una dosis de 40mg/kg; en el lote 3, se utilizó una dosis de 80mg/kg; y para el lote 4, se utilizó una dosis de 160mg/kg del compuesto Thelzán 101; y como lote control se emplearon los mismos animales que se utilizaron como lote control en la etapa 1 administrándoles únicamente SSF.

**Cuadro 5.** Dosis de sobrevivencia-mortalidad para el calculo de la DL50.

<b>Dosis de la 1ra. Etapa</b>			<b>Dosis de la 2da. Etapa (mg/kg)</b>			
<b>10mg/kg</b>	<b>100mg/kg</b>	<b>1000mg/kg</b>				
0/3	0/3	0/3	-	1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

Una vez obtenidas las cuatro dosis correspondientes a la etapa 2, se realizó la administración del compuesto Thelzán 101.

Dos horas después de la administración del compuesto Thelzán 101, se realizó una medición de glucosa en sangre con ayuda de un kit, se registraron los resultados obtenidos y se realizó una comparación con los resultados de glucosa en estado basal y al mismo tiempo se determinó la dosis letal 50 del compuesto Thelzán 101.

La dosis letal 50 se obtuvo por media geométrica sobre las dosis para las cuales fueron encontrados los siguientes resultados de sobrevivencia-mortalidad: 0/1 y 1/1.

➤ ***Estudio histopatológico y ultraestructural de hígado y páncreas.***

***Etapas 3.***

En esta etapa se buscó a nivel ultraestructural el daño que pudo haber provocado el compuesto Thelzán 101 en hígado así como su posible capacidad regeneradora de células  $\beta$  pancreáticas en los animales a los cuáles se les administró el compuesto.

Para esto se utilizaron los animales que sobrevivieron en las etapas anteriores utilizando como lote control los mismos animales empleados en las etapas anteriores.

Al lote control, se le administró SSF, y a los otros lotes se les administró la misma dosis del compuesto Thelzán 101, que fue una dosis de 25mg/kg realizando la administración los días lunes y viernes de cada semana durante un periodo de dos meses empleando siempre la misma dosis del compuesto Thelzán 101, así mismo, se realizó una determinación de glucosa en sangre por semana, durante un periodo de dos meses.

*Procesamiento de muestras para microscopia electrónica de transmisión..*

Una vez terminado ese periodo, se sacrificaron a todos los animales restantes y se les extrajo el hígado y páncreas.

Los órganos se expusieron a una solución fijadora compuesta por PBS que se utiliza como amortiguador y para-formaldehído que se emplea como fijador en una proporción de 1:4 y con un pH de 7.2. Posteriormente, se realizan 3 lavados con PBS, cada uno de ellos por 15 minutos.

Después de los 3 lavados con el amortiguador, se pusieron las muestras en una solución de tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora (esto se debe realizar en una campana ya que el tetróxido de osmio es muy tóxico).

Una vez concluido ese tiempo, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación, el cuál se realizó en pasos sucesivos con concentraciones de alcohol ascendentes (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95° y absoluto), dejando las muestras en cada una de estas soluciones durante 15 minutos, excepto en el alcohol absoluto donde la muestra se deja durante 20 minutos y se realiza por duplicado.

Una vez concluido el proceso de deshidratación, las muestras se incluyeron en resina epóxica (Epon 812), para ello el alcohol fue sustituido por resina mediante el pase de las muestras en una mezcla de alcohol etílico absoluto en una proporción de 1:3 durante 24 horas; concluido ese tiempo, la muestra se puso en otra solución de resina y alcohol etílico absoluto en una proporción de 2:2 durante 2 horas; posteriormente la muestra se puso en una nueva solución de resina y alcohol etílico absoluto en un proporción de 3:1 durante 2 horas.

Transcurrido ese tiempo, la muestra se puso en resina pura durante 2 horas para finalmente ser sustituida nuevamente por resina pura y se dejó la muestra ahí durante 1 hora.

Al término de ese tiempo, las muestras se pusieron en recipientes adecuados para la realización de los cortes en un ultramicrotomo, y fueron llenados con resina pura y posteriormente se sometieron a una temperatura de 60°C durante 36 horas.

Una vez procesadas las muestras, se realizaron cortes semifinos de 180 y 200 nm de grosor los cuales se montaron en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con azul de toluidina mediante la metodología de rutina.

Posteriormente se realizaron cortes finos de 70 a 80 nm de grosor y se contrastaron con acetato de uranilo durante 20 minutos y citrato de plomo durante 10 minutos.

Las muestras se revisaron en un microscopio electrónico de transmisión de la marca Zeiss EM 900 con un voltaje de aceleración de 50kv.

#### *Procesamiento de muestras para microscopia óptica.*

Por otra parte, otra fracción de las muestras fijadas con la solución de fosfatos y para-formaldehído al igual que para microscopia electrónica se llevaron a un proceso de deshidratación y posteriormente se incluyeron en parafina, después de la inclusión, se realizaron los cortes histológicos y se desparafinaron, y finalmente las muestras se hidrataron para que ser teñidas con hematoxilina-eosina de Harris y así poder efectuar el estudio histopatológico con ayuda de un microscopio óptico.

#### *Procesamiento de muestras para tinciones específicas para células $\beta$ pancreáticas.*

- Aldehído Fucsina.

Se adhirieron los cortes pancreáticos a las laminillas y se removió la parafina de manera usual mediante la utilización de xilol; posteriormente, se lavaron las laminillas con alcohol absoluto seguido por alcohol al 96%; posteriormente, las laminillas se sumergieron en una solución de alcohol al 75% con cristales de iodina durante 10min en un vaso Coplin, una vez cumplido el tiempo, las laminillas se lavaron con agua.

Las laminillas fueron sumergidas en una solución de tiosulfato de sodio-alcohol al 96%-agua destilada durante 20min; concluido el tiempo, se lavaron con agua. Finalmente se sumergieron en una solución de fucsina básica-alcohol al 70%-ácido clorhídrico concentrado-paraldehído durante 20min y se realizó el estudio con ayuda de un microscopio óptico.

- Azul de Toluidina.

Las laminillas con los cortes pancreáticos fueron desparafinados y se sumergieron en una solución de azul de toluidina durante 5min. Transcurrido el tiempo, se dejaron secar las laminillas y se observaron al microscopio.

- Tinción de Mallory.

Las laminillas con los cortes pancreáticos fueron desparafinados y deshidratados, posteriormente se sumergieron en una solución de ácido sulfúrico concentrado-permanganato de potasio-agua destilada durante 30seg. hasta obtener una coloración rojiza-café; posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron con hematoxilina de Harris por 10min. Una vez realizada la tinción, las laminillas se sumergieron en una solución de carbonato de litio y nuevamente se enjuagaron con agua destilada. Finalmente, las laminillas fueron sumergidas en una solución de azul de anilina fosfomolibdico-anaranjado G durante 12 horas y se observaron las laminillas con ayuda de un microscopio óptico. Para obtener resultados más claros, se realizó una contratinción empleando laminillas previamente teñidas con aldehído fucsina y posteriormente fueron sumergidas en la solución de azul de anilina fosfomolibdico-anaranjado G durante 12 horas y se observaron con la ayuda de microscopio óptico.

## VI. RESULTADOS.

### DOSIS LETAL 50 (ETAPA 1).

**Cuadro 6.** Comparación de glucosa basal y post-administración de Thelzán 101 e intervalo de dosis que produce efectos tóxicos para la etapa 1.

Lote	Dosis administrada de Thelzán 101(mg/kg)	Glucosa Basal (mg/dL)	Glucosa 1hr. post-admon. (mg/dL)	Toxicidad de Thelzán 101
Control	0	116.39	118.63	Vivo
Control	0	118.03	116.39	Vivo
Control	0	114.75	116.39	Vivo
1	10	116.39	103.27	Vivo
1	10	122.95	113.11	Vivo
1	10	111.47	109.83	Vivo
2	<b>100</b>	118.63	83.6	<b>Muerto</b>
2	<b>100</b>	124.59	96.72	<b>Muerto</b>
2	<b>100</b>	113.11	90.16	<b>Muerto</b>
3	<b>1000</b>	114.75	-	*
3	<b>1000</b>	111.47	-	*
3	<b>1000</b>	111.47	-	*

En la tabla 2 podemos observar que en los lotes a los cuales se les administró el compuesto Thelzán 101 existe una disminución significativa de los niveles de glucosa con respecto a los niveles registrados de glucosa basal, de igual forma, se observa que entre mayor es la dosis administrada de Thelzán 101, la disminución de glucosa es mayor, no así con los niveles del lote control que al no haberles administrado el compuesto Thelzán 101, sino solución salina fisiológica, presentan niveles de glucosa similares en su etapa basal y después de la administración de solución salina fisiológica.

\*Es importante destacar que a los animales del lote 3 (1000mg/kg), no se realizó la determinación de glucosa después de la administración de Thelzán 101 debido a que la dosis a administrar era demasiado elevada, esto se dedujo observando el comportamiento de los animales del lote anterior en donde los animales fallecieron aproximadamente 1 hora después de la administración del compuesto, así que se podía suponer que al administrar

una dosis mucho mayor se provocaría la muerte de los animales. Por esto y siguiendo los lineamientos establecidos de sacrificio innecesario de animales, se decidió no hacer la administración del compuesto. Esto permitió que los animales fueran utilizados para etapas posteriores.

En cuanto a la toxicidad, se observa que la dosis tóxica del compuesto Thelzán 101 se encuentra en el intervalo de dosis de 100 a 1000mg/kg de peso corporal de las ratas, esto se deduce debido a que los animales de estos lotes fallecieron después de la administración del compuesto Thelzán 101, en cambio, los animales del lote control a los cuales sólo se les administró SSF y los animales del lote 1 a los cuales se les administró una dosis de 10mg/kg de Thelzán 101, no fallecieron después de la administración.

### DOSIS LETAL 50 (ETAPA 2).

**Cuadro 7.** Comparación de glucosa basal y post-administración de Thelzán 101 e intervalo de dosis que produce efectos tóxicos para la etapa 2.

Lote	Dosis administrada de Thelzán 101(mg/kg)	Glucosa Basal (mg/dL)	Glucosa 1hr. post-admon. (mg/dL)	Toxicidad
Control	0	119.67	116.39	Vivo
1	20	121.31	106.55	Vivo
1	20	114.7	109.83	Vivo
1	20	124.59	103.27	Vivo
2	40	109.83	104.91	Vivo
2	40	116.39	98.36	Vivo
2	40	118.03	98.36	Vivo
3	80	116.39	95.08	Vivo
3	80	121.31	83.6	Vivo
3	80	124.59	81.96	Vivo
4	<b>160</b>	121.31	55.73	<b>Muerto</b>
4	<b>160</b>	121.31	57.37	<b>Muerto</b>
4	<b>160</b>	114.7	55.73	<b>Muerto</b>

En la tabla 3 podemos observar 4 diferentes dosis de Thelzán 101 las cuales fueron seleccionadas de acuerdo al cuadro 1 de sobrevivencia-mortalidad para el cálculo de la DL50, y manteniendo el lote control de la etapa anterior administrando únicamente SSF.

En cuanto a los niveles de glucosa, podemos observar que en el lote control no existe una variación significativa debido a que se le administró SSF, en cambio, los lotes en los cuales hubo la administración del compuesto Thelzán 101, se observa que en todos ellos existe una disminución de los niveles de glucosa con respecto a los niveles de glucosa basal.

Además, se puede observar una vez más que la hipoglucemia se ve influenciada por la dosis administrada de Thelzán 101, esto debido a que entre mayor es la dosis, la hipoglucemia también incrementa, esto es, el lote 1 (20mg/kg) presenta los niveles de glucosa mayores de esta etapa, sin tomar en cuenta el lote control, y el lote 4 (160mg/kg), presenta los niveles de glucosa más bajos y teniendo una mayor diferencia con respecto a los niveles de glucosa basal de ese lote.

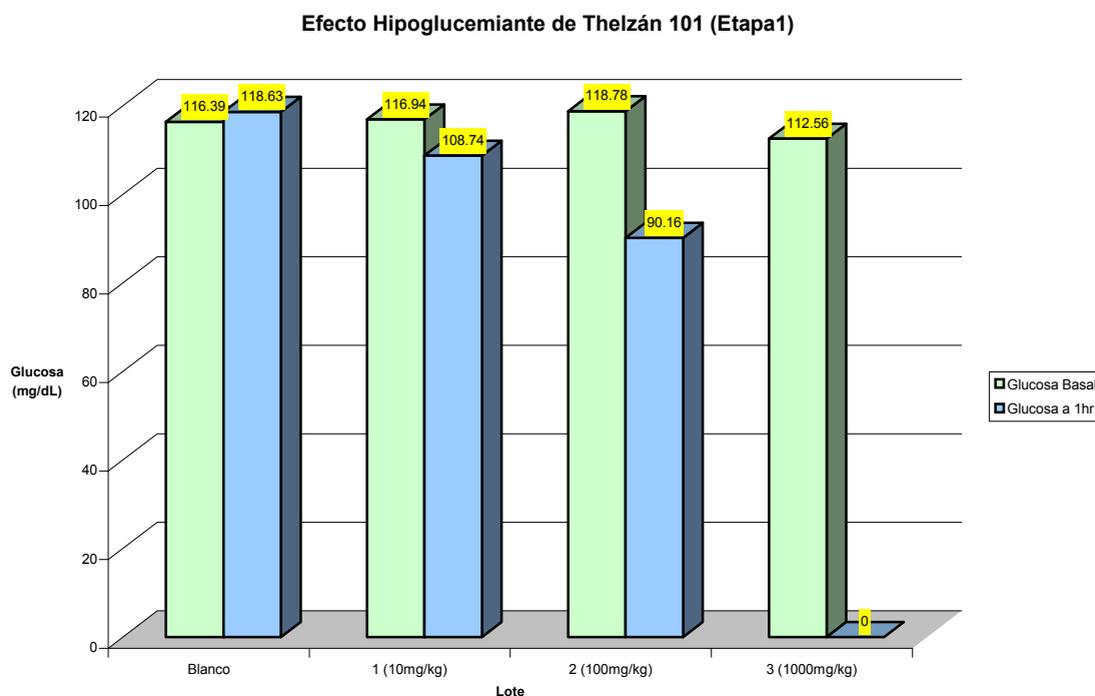
En cuanto a la toxicidad, se puede observar que todos los animales del lote 4 (160mg/kg) fallecieron después de la administración del compuesto Thelzán 101, en cambio, los animales de los otros lotes siguieron vivos y fueron utilizados para la siguiente etapa.

Con la ayuda de las dosis empleadas en esta etapa 2, la dosis letal 50 se obtuvo por media geométrica sobre las dosis para las cuales fueron encontrados los siguientes resultados de sobrevivencia-mortalidad: 0/1 y 1/1, es decir, se tomó la dosis del lote donde todos los animales que componían el lote murieron debido a la administración del compuesto Thelzán 101 y la dosis del lote anterior donde ningún animal que componía al lote murió debido a la administración del compuesto Thelzán 101.

Para esto se utilizaron las dosis de: 80mg/kg que fue la dosis en la cuál ningún animal del lote correspondiente murió debido a la administración del compuesto Thelzán 101 y también se tomó la dosis de 160mg/kg que fue la dosis en la cuál todos los animales que componían al lote murieron debido a la administración del compuesto Thelzán 101. Y se obtuvo el siguiente resultado:

**DL50 del compuesto Thelzán 101 = 113.137mg/kg**

## EFFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL COMPUESTO THELZÁN 101 EN LA ETAPA 1.



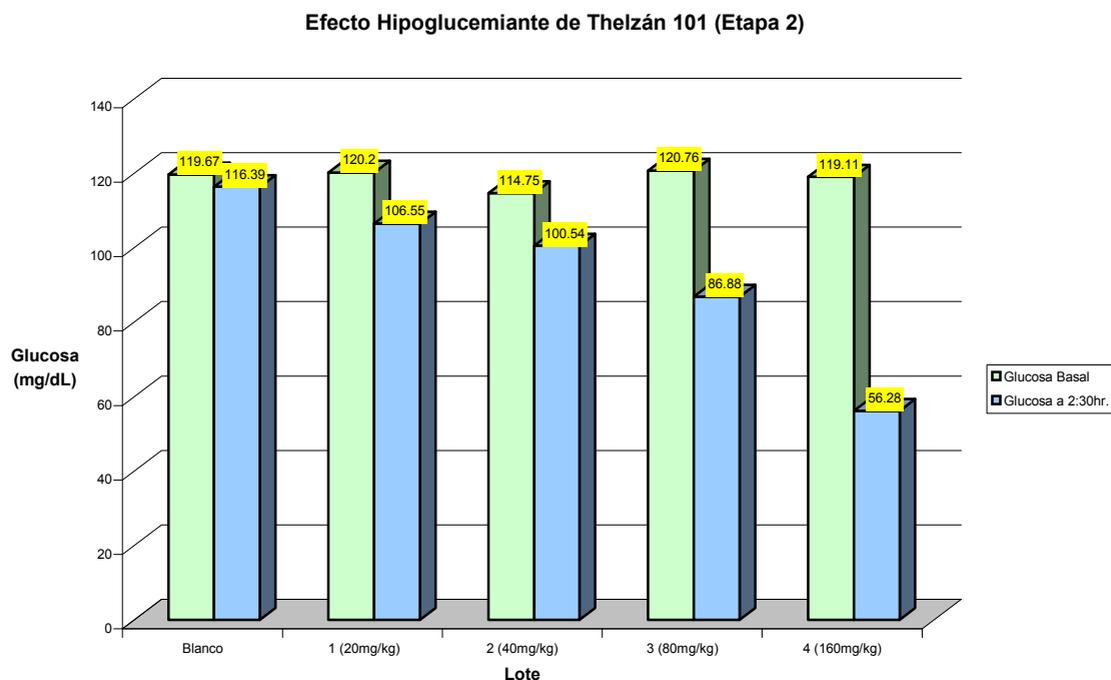
**Gráfica 1.** Concentración plasmática de glucosa basal y post-administración de Thelzán 101 en la etapa 1.

En la gráfica 1 podemos observar que en los lotes donde hubo administración del compuesto Thelzán 101, lotes 1 y 2 donde la dosis administrada fue de 10 y 100mg/kg respectivamente, hubo una disminución en los niveles de glucosa con respecto a los niveles basales.

También se puede observar que en el lote 3 (1000mg/kg), no existe un valor post-administración, esto debido y como ya se explicó anteriormente, a que no se realizó la administración del compuesto Thelzán 101 ya que la dosis era demasiado elevada y no tenía valor ético el sacrificio de animales innecesariamente ya que el valor deseado ya se había obtenido.

En cuanto al lote control, se observan valores semejantes debido a que no hubo administración de Thelzán 101 sino de SSF que no afecta el valor de glucosa sanguínea.

## EFFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL COMPUESTO THELZÁN 101 EN LA ETAPA 2.

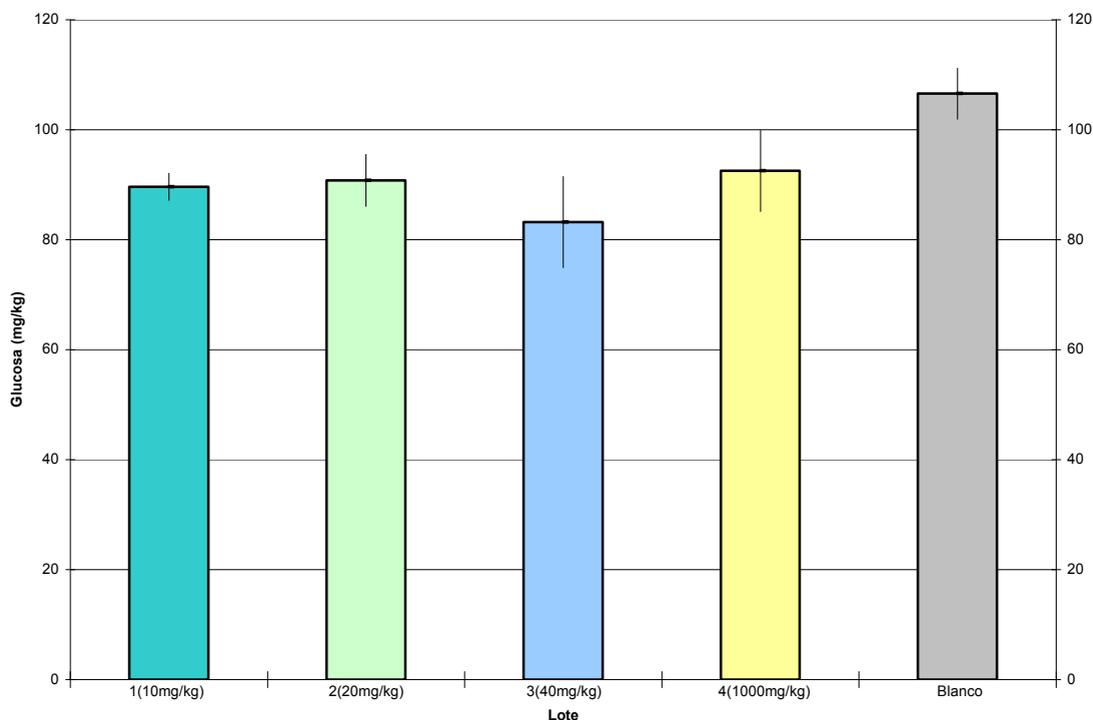


**Gráfica 2.** Concentración plasmática de glucosa basal y post-administración del Thelzán 101 en la etapa 2.

En la gráfica 2 se puede observar una comparación entre los niveles de glucosa basal y los niveles de glucosa después de haber realizado la administración de Thelzán 101, como se observa en la gráfica, los niveles de glucosa basal en todos los lotes incluyendo el lote control, son muy semejantes; después de realizar la administración de Thelzán 101 en los lotes 1, 2, 3 y 4 se observa una disminución en los niveles de glucosa, además podemos observar que esa disminución al igual que en la etapa 1, se va incrementando de acuerdo a la dosis administrada, esto es, los niveles de glucosa se ven afectados por la dosis administrada de Thelzán 101, como lo muestra la gráfica; el lote 4 (160mg/kg), presenta la disminución de glucosa más significativa y el lote 1 (20mg/kg), la menos significativa, esto sin tomar en cuenta el lote control al cuál sólo se le administró SSF que no provoca variación significativa en los niveles de glucosa como se puede observar en la gráfica.

## EFFECTO HIPOGLUCEMIANTE DEL COMPUESTO THELZÁN 101 ADMINISTRADO DURANTE 2 MESES.

Efecto Hipoglucemiante de Thelzán 101 Durante 2 Meses

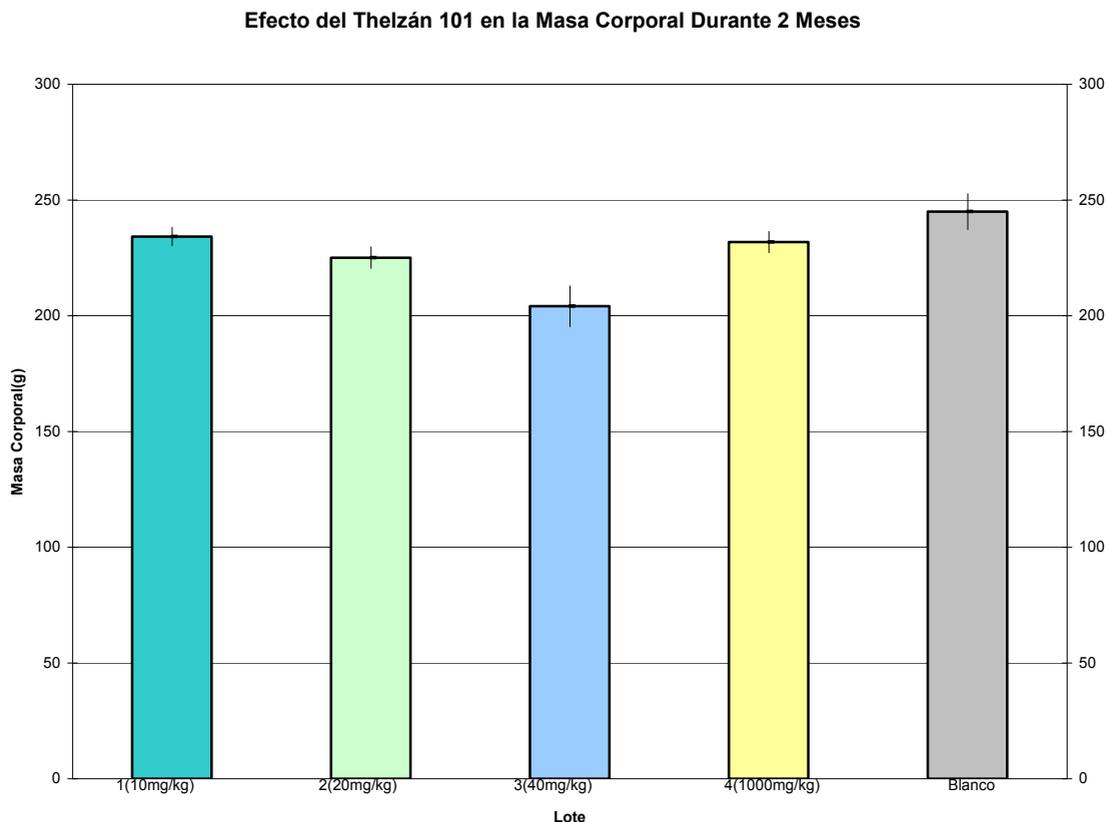


**Gráfica 3.** Promedio de la concentración plasmática de glucosa en un periodo de 2 meses observándose su desviación estándar.

Para la realización de esta fase del proyecto se utilizaron los animales sobrevivientes de la etapas anteriores y se utilizó una dosis de 25mg/kg la cuál fue administrada durante un periodo de 2 meses. Durante este periodo se realizaron determinaciones de glucosa, una vez por semana, y la administración de Thelzán 101 se realizó lunes y viernes.

Se obtuvieron los promedios de los niveles de glucosa en cada lote, y como se puede observar en la gráfica 3, los lotes 1, 2, 3 y 4 en los cuales se realizó la administración de Thelzán 101, se observan unos niveles de glucosa significativamente menores que los del lote control; y haciendo una comparación de los niveles de glucosa entre los 4 lotes a los cuales se les administró Thelzán 101 se puede observar que los valores son muy similares, con excepción del lote 3 que presenta un nivel de glucosa inferior.

## EFFECTO DEL COMPUESTO THELZÁN 101 EN LA MASA CORPORAL



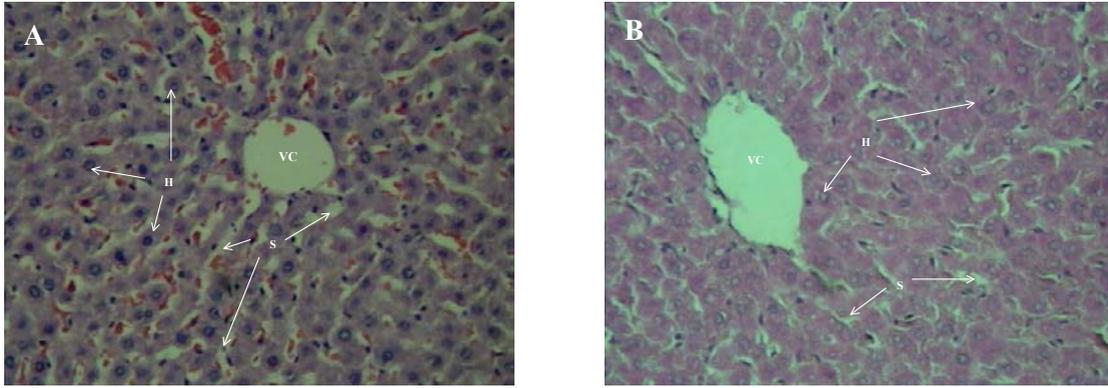
**Gráfica 4.** Promedio de la masa corporal en un periodo de 2 meses observándose su desviación estándar

Para obtener el volumen de administración necesario del compuesto Thelzán 101 para cada una de las diferentes dosis, se obtuvieron los pesos de los animales de cada uno de los lotes, esto se realizó durante todo el periodo que se tuvieron a los animales y los datos que se encuentran en la gráfica 4 solamente se refieren al periodo en el cual la administración de Thelzán 101 fue permanente, esto es, durante 2 meses.

Los resultados obtenidos manifiestan que el compuesto Thelzán 101 probablemente provocó una disminución en la masa corporal de los animales que conformaban los lotes 1, 2, 3 y 4 ya que en comparación con el lote control al cuál solo se le administró SSF, se observa que los valores se encuentran por debajo del lote control, aunque en algunos casos la diferencia no es significativa como en el lote 1 y 4, en los lotes 2 y 3 se observa una diferencia significativa.

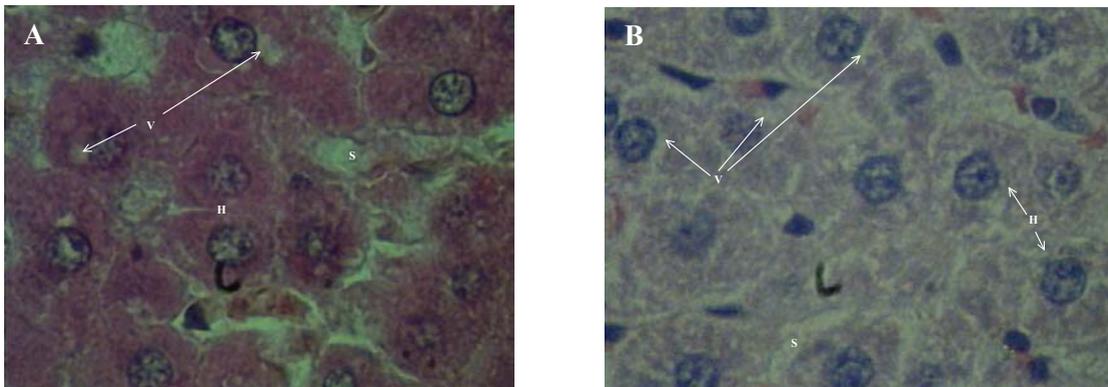
## RESULTADOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA:

### ➤ *Evaluación estructural hepática.*



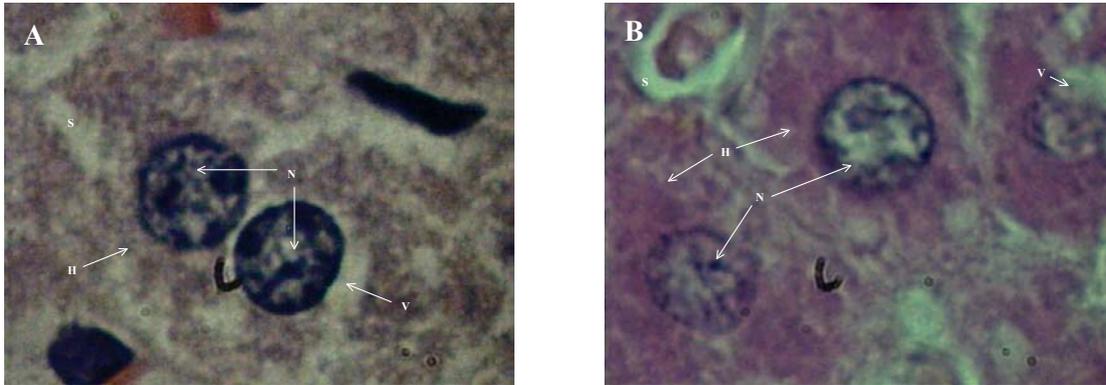
**Fig.21.** Hígado teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).100X.

En ambos órganos el parénquima se encontró poblado por cordones de hepatocitos (H) con forma cúbica, separados por los sinusoides (S). Note la vena central (VC).



**Fig.22.** Hígado teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).400X.

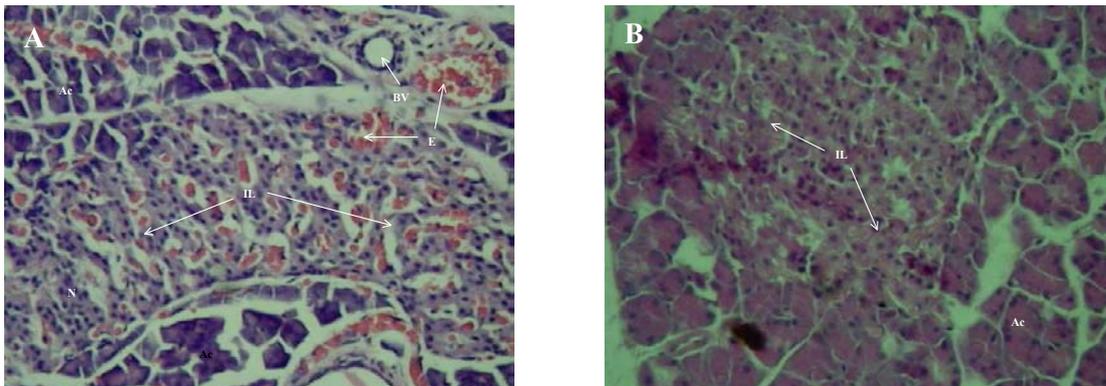
Hepatocitos con apariencia redonda y bien definidos, en el citoplasma de algunos hepatocitos se encontraron vacuolas (V); presencia de sinusoides (S) ocupados por eritrocitos. Hepatocitos con apariencia redonda y bien definida.



**Fig.23.** Hígado teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).400X.

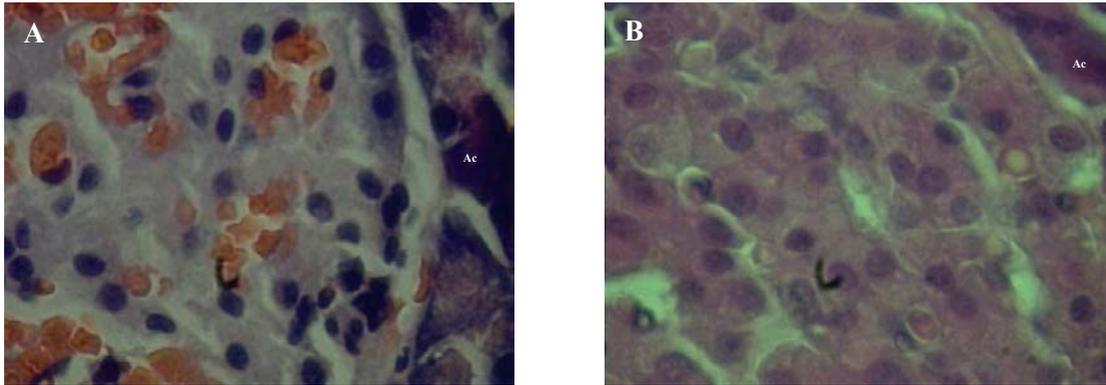
Hepatocitos (H) bien definidos con núcleo (N) redondo bien definido y cromatina medianamente densa; presencia de vacuolas (V) en el citoplasma de algunos hepatocitos.

➤ ***Evaluación estructural pancreática.***



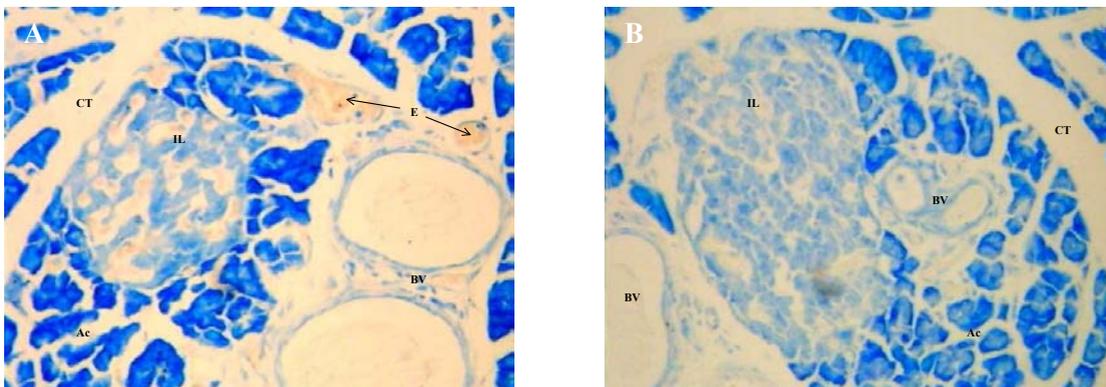
**Fig.24.** Páncreas teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).100X.

En ambos órganos la parte exócrina del parénquima pancreático presenta acines (Ac) bien definidos; en ambos casos existe la presencia de Islotes de Langerhans (IL) algunos con apariencia alargada y otros con apariencia ovalada; vasos sanguíneos (BV) con luz amplia y algunos de ellos ocupados por eritrocitos (E).



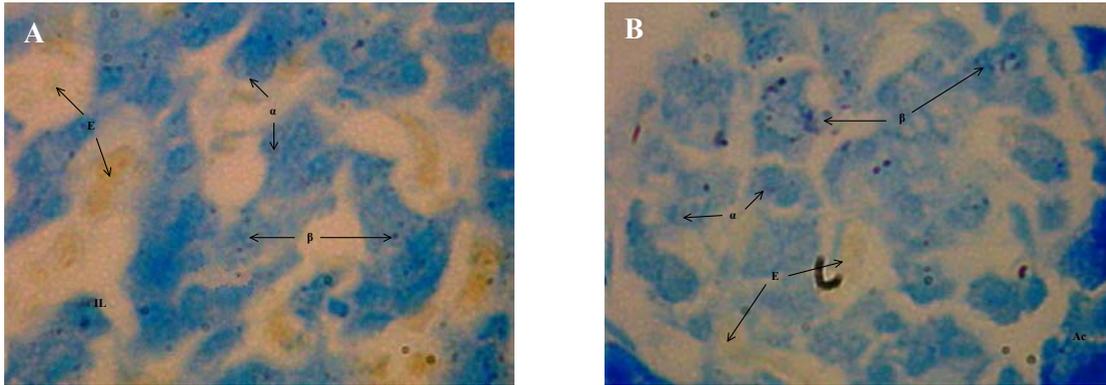
**Fig.25.** Páncreas teñido con Hematoxilina-Eosina de animales control (A) y tratados (B).400X.

Se observan algunos acines pancreáticos (Ac) e islotes Pancreáticos (IL) conteniendo diversas líneas celulares características de un islote, dichas células presentan núcleos bien definidos teñidos basofílicamente y con cara abierta.



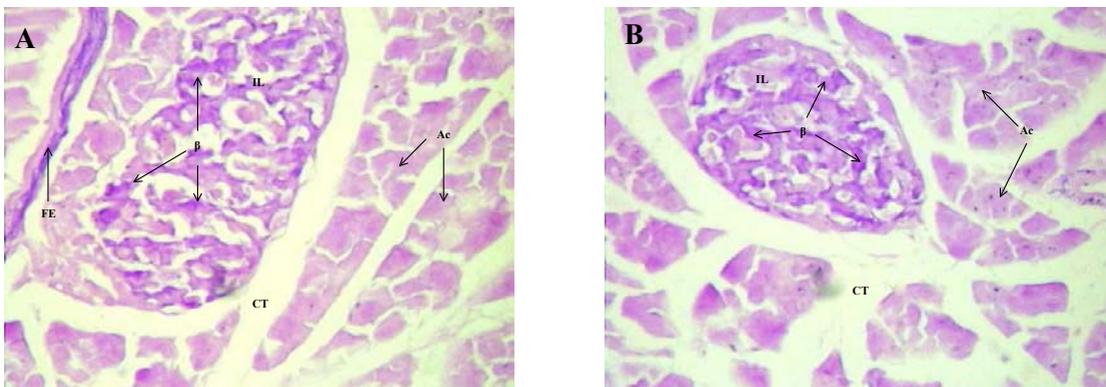
**Fig.26.** Páncreas teñido con Azul de Toluidina de animales control (A) y tratados (B).100X.

En ambos casos se observan acines (Ac) pancreáticos teñidos intensamente de color azul con una estructura bien definida; se observan vasos sanguíneos (BV) bien delimitados, algunos con presencia de eritrocitos (E); presencia de tejido conjuntivo (CT); islotes pancreáticos (IL) teñidos ligeramente de color azul bien delimitados de diversos tamaños y formas.



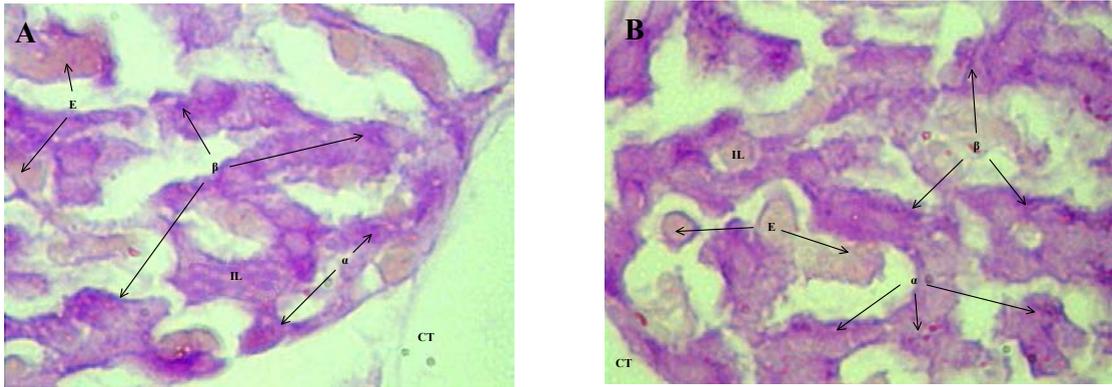
**Fig.27.** Islote pancreático teñido con Azul de Toluidina de animales control (A) y tratados (B).400X.

Presencia de gránulos de color violeta-rojizo correspondiente a células  $\beta$  así como presencia de eritrocitos (E); en el lote control (A) se observa menor cantidad de gránulos que en el lote tratado (B).



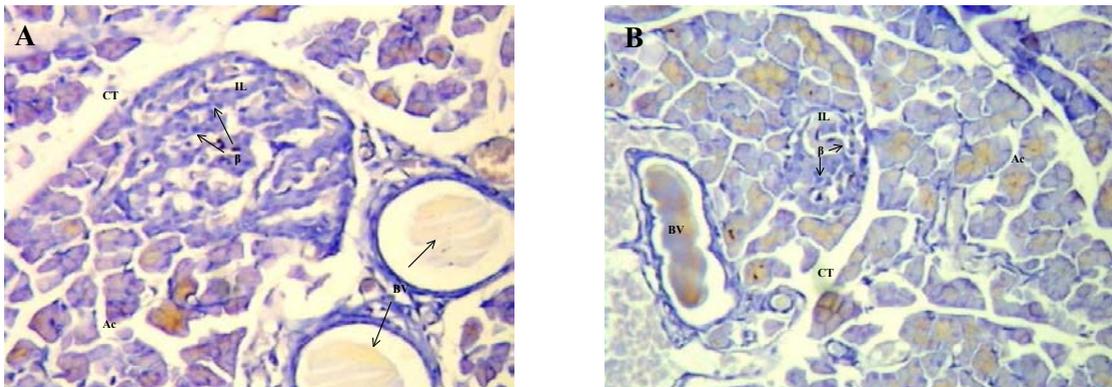
**Fig.28.** Páncreas teñido con Aldehído Fucsina de animales control (A) y tratados (B).100X

En ambos casos existe la presencia de acines pancreáticos (Ac) teñidos tenuemente de color violeta-rosa los cuáles están bien delimitados y entre los cuáles circula tejido conjuntivo (CT); en A, se aprecia un fibra elástica (FE); en ambos casos se observa un islote pancreático (IL) bien delimitado con sitios teñidos de color violeta intenso correspondientes a células  $\beta$ .



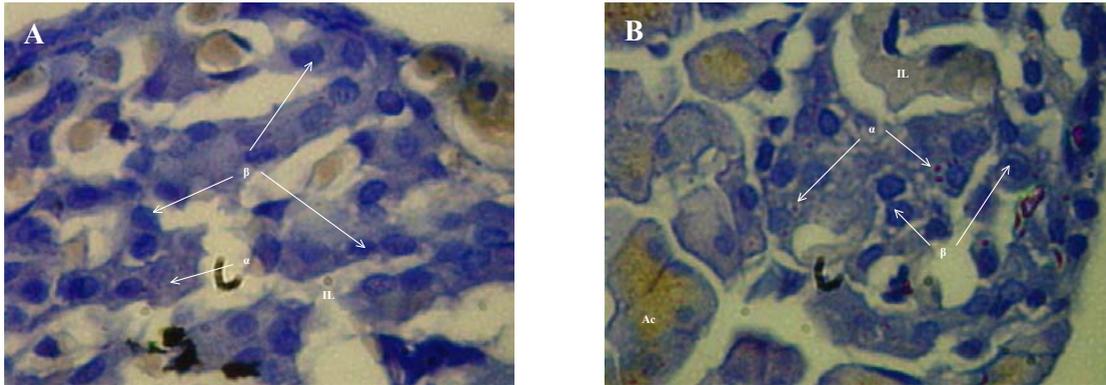
**Fig.29.** Islote pancreático teñido con Aldehído Fucsina de animales control (A) y tratados (B).400X.

En ambos casos, se observa un islote pancreático (IL) con zonas teñidas de color violeta intenso correspondientes a células  $\beta$ , en B, se observa ligeramente una mayor coloración en B que en A; en ambos casos se observan zonas que presentan granulaciones rojizas correspondientes a células A; presencia de eritrocitos (E) y tejido conectivo (CT); presencia de luz pancreática amplia.



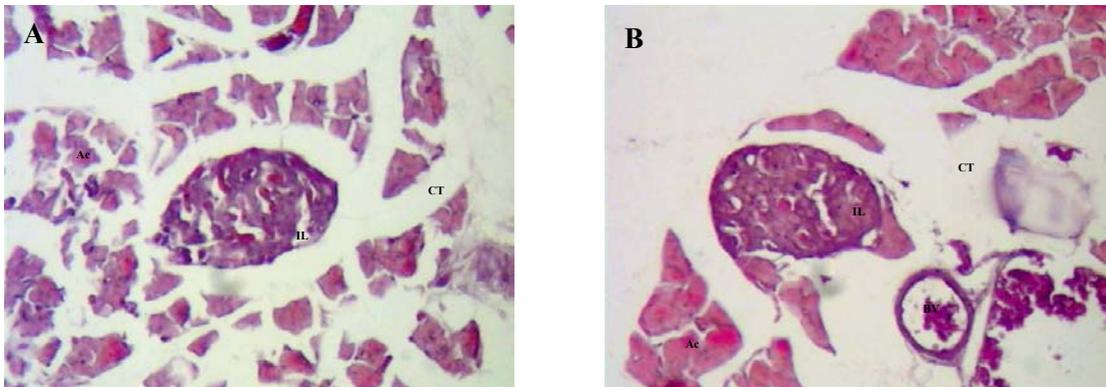
**Fig.30.** Páncreas teñido con Tricromica de Mallory-Hematoxilina de animales control (A) y tratados (B).100X.

En ambos casos se observan acines pancreáticos teñidos de color violeta claro con zonas teñidas de color amarillo; se observan vasos sanguíneos (BV) algunos ocupados por eritrocitos (E) y tejido conectivo (CT) delimitando algunas zonas; se observan islotes pancreáticos (IL) pequeños con presencia de núcleos teñidos intensamente de color violeta.



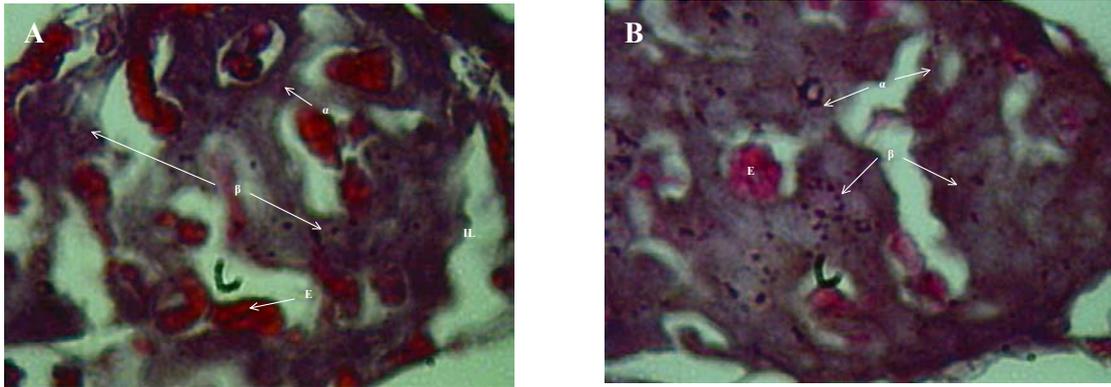
**Fig.31.** Islole pancreático teñido con Tricromica de Mallory-Hematoxilina de animales control (A) y tratados (B).400X.

En ambos casos se observa un islole pancreático (IL) donde se observan núcleos bien definidos teñidos intensamente de color violeta-azul correspondientes a células  $\beta$  y algunos gránulos teñidos de color rojizo correspondientes a células  $\alpha$ .



**Fig.32.** Páncreas teñido con Tricromica de Mallory de control (A) y tratados (B).400X.

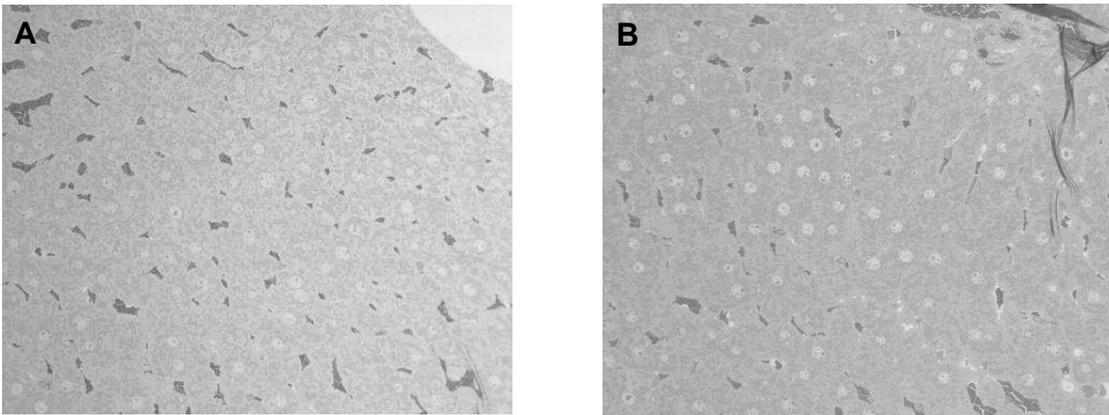
En ambos casos se observan los acines pancreáticos (Ac) bien definidos teñidos tenuemente de color violeta; se observa el tejido conjuntivo (CT) delimitando diversas zonas y un islole pancreático (IL) teñido de color violeta intenso.



**Fig.33.** Islole pancreático teñido con Tricromica de Mallory de animales control (A) y tratados (B).400X.

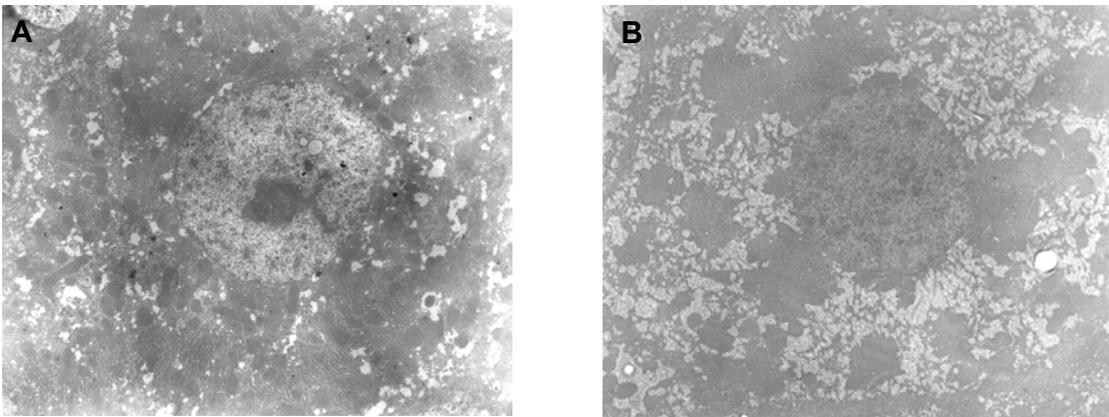
En ambos casos se observan islotes pancreáticos presentando granulaciones violeta-azules correspondientes a células  $\beta$ ; presencia de eritocitos (E). Se puede observar que en B existe una cantidad mayor de granulaciones violeta-azul que B.

## RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.



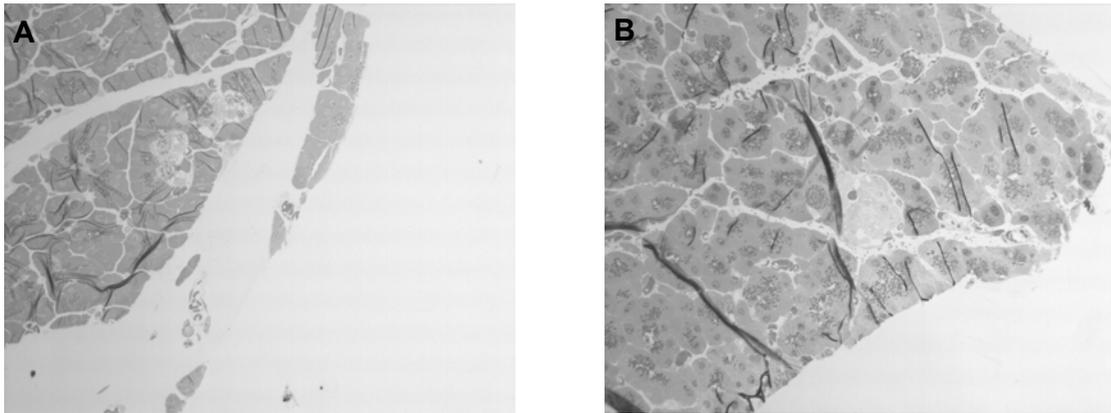
**Fig.34.** Cortes semifinos de hígado teñido con Azul de Toluidina de animales control (A) y tratados (B).100X

En ambos casos se observan hepatocitos con forma ovoide y bien definida con la presencia de núcleos redondos traslucidos.



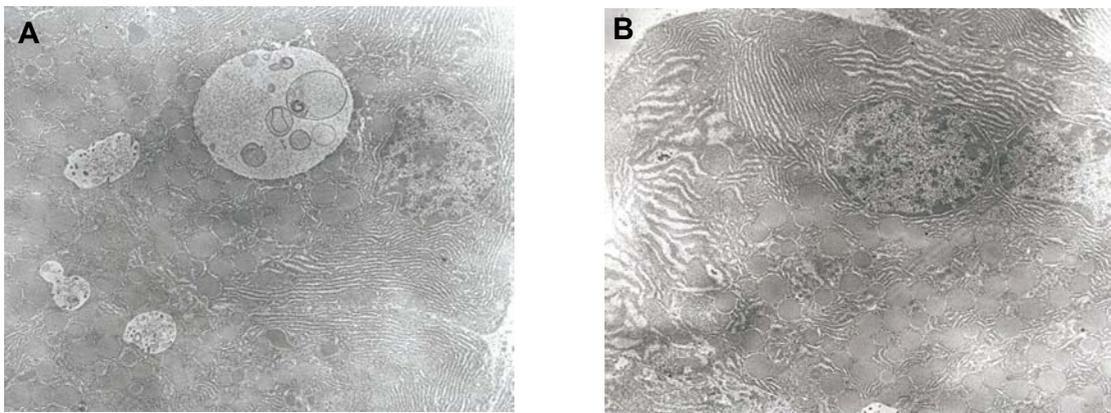
**Fig.35.** Cortes finos de hígado de animales control (A) y tratados (B). Ur-Pb, 4400X.

Se aprecia núcleo redondeado con cromatina fina granular, a nivel del citoplasma se aprecian moderada cantidad de mitocondrias y RER con espacios electrolucidos moderados multifocales.



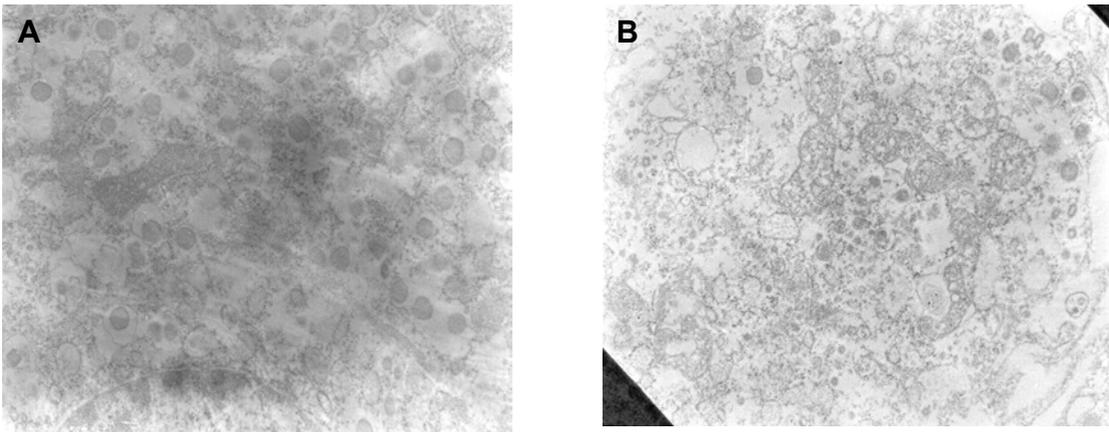
**Fig.36.** Cortes semifinos de páncreas teñido con Azul de Toluidina de animales control (A) y tratados (B).100X

En el corte correspondiente a los a los animales tratados (A), se aprecian células acinares con forma característica y dos islotes pancreáticos con forma irregular; en el de los animales tratados (B), se observan celulares acinares con forma regular y presencia de gran pigmentación, se observa un islote pancreático con ligera pérdida de celularidad.



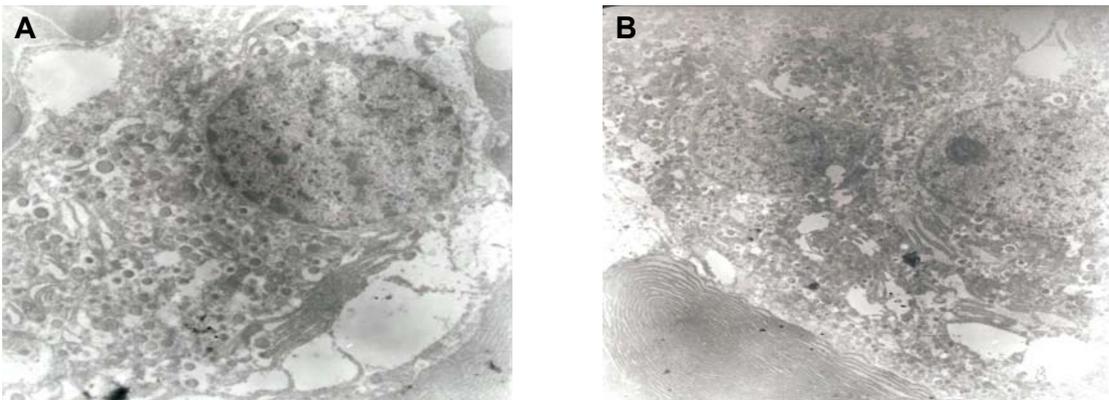
**Fig.37.** Cortes finos de páncreas exocrino de animales control (A) y tratados (B). Ur-Pb, 3000X

En los animales control (A), se aprecia en el citoplasma de una célula del acini pancreático, vacuolas de diferentes tamaño con contenido fino granular no identificado. Animales tratados (B), se aprecia en el citoplasma de una célula del acini pancreático, abundante RER el cual se observa dilatado en algunas zonas.



**Fig.38.** Cortes finos de páncreas endocrino de animales control (A) y tratados (B).Ur-Pb, 12 000X

En los animales control (A), se aprecia en el citoplasma de una célula del islote pancreático, múltiples gránulos electrodensos (gránulos neuroendocrinos) y escasas mitocondrias y RER. Animales tratados (B), se aprecia en el citoplasma de una célula del islote pancreático, pérdida de gránulos electrodensos (gránulos neuroendocrinos) y escasas mitocondrias ligeramente tumefactas.



**Fig.39.** Cortes finos de células B pancreáticas de animales control (A) y tratados (B).Ur-Pb, 3000X.

En los animales control (A), se aprecia el núcleo de la célula, gran cantidad de gránulos electrodensos, pocas mitocondrias y poco retículo endoplásmico rugoso. Animales tratados (B), se observa el núcleo de la célula, poca presencia de gránulos electrodensos, pocas mitocondrias y abundante retículo endoplásmico rugoso.

## VII. DISCUSIÓN.

- *Efecto Hipoglucemiante y Cálculo de la DL50.*

En términos generales un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos, a su vez se puede señalar como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de una sustancia o material, es medida en términos de la respuesta biológica que produce. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL50 por dosis letal media.<sup>26</sup>

La determinación de la DL50, se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias. En la investigación fitoquímica valiéndose del principio de que farmacología es simplemente toxicología a bajas concentraciones o toxicología es farmacología a concentraciones altas se puede correlacionar la bioactividad con el valor de la DL50 y al mismo tiempo su grado de toxicidad.<sup>26</sup>

En esta investigación se emplearon animales sanos debido a que se buscaba comprobar el efecto hipoglucemiante de Thelzán 101 en condiciones normales, así como para determinar su toxicidad y el posible poder regenerativo de células  $\beta$  pancreáticas.

La investigación se realizó en tres etapas, las primeras dos etapas para la determinación de la toxicidad de Thelzán 101 y además para comprobar el efecto hipoglucemiante que Thelzán 101 producía en ratas sanas mediante la medición de glucosa sanguínea; y una tercera etapa para evaluar el posible daño en hepatocitos y el posible efecto regenerativo de células  $\beta$  pancreáticas producido por Thelzán 101 mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión.

En la primera etapa se seleccionaron tres diferentes dosis: 10, 100 y 1000mg/kg, esto para establecer un intervalo de las dosis que producen efectos tóxicos, además un lote control que se utilizó durante toda la investigación como control.

En el lote correspondiente a una dosis de 10mg/kg se observó que después de la administración de Thelzán 101, de los tres animales, ninguno presentó cambios que pudieran afectar su salud y provocar su muerte, esto nos hizo pensar que la dosis de 10mg/kg no es una dosis lo suficientemente potente para provocar un daño tóxico en el organismo de los animales.

Los animales del siguiente lote correspondiente a 100mg/kg, después de administrarles el Thelzán 101, dos de ellos inmediatamente mostraron efectos tóxicos debido a que presentaban diversos síntomas como inmovilidad y respiración agitada lo que los llevo a la muerte después de una hora, esto es, que de los tres animales empleados en este lote sólo uno sobrevivió aunque también presentó signos de inmovilidad y respiración agitada.

Finalmente, el lote correspondiente a una dosis de 1000mg/kg, haciendo la comparación con el lote anterior en el cuál se tenía una dosis 10 veces menor y observando que todos los animales presentaron signos de intoxicación debido a la sobredosis y que dos de ellos murieron, pensamos que una dosis de 1000mg/kg era una dosis muy elevada y que obviamente iba a provocar que todos los animales de este lote murieran, por lo que decidimos no realizar la administración y emplear los animales para etapas sucesivas.

En lo que se refiere a la mortalidad, se determinó que de los tres animales que conformaban este lote, ninguno sobrevivió debido a la dosis tan elevada.

En base a los resultados obtenidos de sobrevivencia-mortalidad de las dosis de 10, 100 y 1000mg/kg, que fueron de 0/3, 2/3 y 3/3, respectivamente, procedimos a realizar la selección de las siguientes dosis según la tabla de Dietrich-Lorke, que fueron de: 20, 40, 80 y 160mg/kg de peso corporal; el método de Dietrich-Lorke es un método eficaz para la determinación de la dosis letal media debido a que es un método que requiere de poca cantidad de animales para sus estudios y se obtienen resultados confiables.

En esta segunda etapa, se tuvieron 4 lotes de tres animales por lote, y como se mencionó anteriormente, utilizando el mismo lote control que en la etapa anterior.

Al lote correspondiente a una dosis de 20mg/kg, pudimos observar que ninguno de los animales presentaba cambio alguno después de administrarles Thelzán 101, por lo que pensamos que esa dosis es muy baja para producir algún efecto tóxico que pudiera afectar la salud de los animales.

En el siguiente lote, correspondiente a una dosis de 40mg/kg, observamos que los animales presentaban un poco de somnolencia y una respiración ligeramente agitada pero que no provocó el fallecimiento de alguno de ellos, por lo que igual que en el lote anterior, pensamos que la dosis empleada si bien provocaba algunos efectos secundarios, no ponía en riesgo la salud de los animales.

En el siguiente lote al cual correspondía una dosis de 80mg/kg, pudimos observar que después de realizar la administración de Thelzán 101, los animales respondían a la dosis presentando signos de inmovilidad y una respiración agitada, esto lo presentaron durante un corto periodo de tiempo, alrededor de 10 minutos, y posteriormente regresaron a la normalidad. Esto nos hace pensar que la dosis administrada comienza a ser ligeramente tóxica y que presenta diversos efectos secundarios pero que no llega a provocar la muerte de los animales.

Finalmente, tenemos al lote correspondiente a una dosis de 160mg/kg, que observando los resultados anteriores, suponíamos que los animales de éste lote fallecerían después de administrarles Thelzán 101. Nuestras sospechas fueron confirmadas ya que después de realizar la administración de Thelzán 101 los animales presentaron cianosis inmediatamente y murieron minutos después. Con los resultados obtenidos de sobrevivencia-mortalidad, pudimos encontrar la dosis que nos fueron útiles para el cálculo de la DL50.

La DL50 fue calculada mediante la determinación de la media geométrica entre la dosis donde la mortalidad-sobrevivencia fue: 0/1 y 1/1, esto es, en la dosis de 80mg/kg y 160mg/kg, obteniendo una DL50 para Thelzán 101 de: 113.137mg/kg.

Este resultado muestra que Thelzán 101 tiene un margen amplio de seguridad para su administración, pero al igual que todos los fármacos, se debe de tener cuidado en su administración debido a que una mala dosificación puede provocar una intoxicación.<sup>48</sup>

En cuanto al efecto hipoglucemiante provocado por Thelzán 101, pudimos observar que éste se presentó desde la primera administración como se muestra en las gráficas 1 y 2, ya que al realizar la comparación de los niveles de glucosa en estado basal y después de la administración de Thelzán 101, podemos observar que en todos los lotes existe una disminución de los niveles de glucosa después de administrarles el Thelzán 101, no así con el lote control que mantiene un nivel de glucosa constante.

Además podemos observar que la disminución de los niveles de glucosa es directamente proporcional a la dosis de Thelzán 101 administrada, ya que nos dimos cuenta que entre mayor era la dosis administrada, los niveles de glucosa disminuían más, incluso se puede observar en las Gráficas 1 y 2 que los niveles de glucosa corresponden a la dosis administrada, esto es, podemos observar que en la etapa que se utilizaron dosis de 10, 100 y 1000mg/kg y en la etapa 2 se utilizaron dosis de 20, 40, 80 y 160mg/kg, los niveles de glucosa obtenidos en el lote de 10mg/kg son menores que los niveles obtenidos en el lote de 20mg/kg, así mismo éstos son menores que los niveles obtenidos en el lote de 40mg/kg.

También, los niveles obtenidos en el lote de 100mg/kg son mayores que los niveles obtenidos en el lote de 80mg/kg pero son menores que los niveles obtenidos en el lote de 160mg/kg.

Como podemos observar, a pesar de que se utilizaron dosis diferentes y en diferentes etapas, al realizar la medición de glucosa estos corresponden de acuerdo a la dosis administrada, por lo que pensamos que entre mayor es la dosis administrada de Thelzán 101, la hipoglucemia será mayor pero también el riesgo de intoxicación, y al incrementar el efecto hipoglucemiante también se incrementa el riesgo de padecer hipoglucemia.

El efecto hipoglucemiante se mantuvo mediante la administración permanente de Thelzán 101 durante un periodo de 2 meses como se observa en la Gráfica 3, allí podemos observar que en todos los lotes los niveles de glucosa se mantuvieron por debajo de los niveles del lote control lo que nos hace pensar que Thelzán 101 mantiene sus características hipoglucemiantes posiblemente durante un largo periodo sin provocar hipoglucemia, siempre y cuando la dosis empleada no sea muy elevada ya que como se mencionó anteriormente la dosis empleada en esta etapa fue de 25mg/kg.

Durante toda la investigación los animales fueron pesados para así obtener el volumen necesario de Thelzán 101 para la diferentes dosis, los pesos fueron registrados y nos dimos cuenta que los animales de los lotes a los cuáles se les realizó la administración de Thelzán 101, tenía variaciones en cuanto a su peso, y como se muestra en la Gráfica 4, al realizar la comparación de pesos con el lote control nos dimos cuenta que en todos los lotes el peso fue menor, lo cuál nos hizo pensar que posiblemente Thelzán 101 posee características lipolíticas, o bien, que al provocar la disminución de glucosa en los animales, el organismo de estos busca otras vías para obtener energía utilizando los lípidos y provocando con ello que bajen de peso.

Aunque la gráfica 4 nos muestra que los resultados obtenidos de lotes administrados con Thelzán 101 se encuentran por debajo de los resultados del lote control, estos resultados son variables y, por lo tanto, no concluyentes ya que los animales iban creciendo y en algunas ocasiones subían de peso y en otras bajaban a pesar de que la alimentación fue la misma en todos los casos.

- ***Efecto Citotóxico en Hepatocitos.***

El hígado, que tiene un aspecto rojizo pardo, es el principal órgano metabólico del organismo y también la glándula de mayor tamaño, tiene más de 500 funciones útiles metabólicas dentro de las que se incluye la destoxicación de sustancias tóxicas y fármacos.<sup>9</sup>

En los estudios histopatológicos realizados al hígado de los animales tanto de lote control como los de lote tratado con Thelzán 101, pudimos observar en la figura 1 que en ambos lotes, el parénquima hepático está constituido por hepatocitos que se agrupan formando placas que se anastomosan entre sí; así como también, la presencia de la vena central del lobulillo hepático (raíz terminal de la vena hepática) que recibe la sangre de los sinusoides y la vierte en las venas sublobulillares. Las placas de los hepatocitos y los sinusoides hepáticos parecen irradiar de la vena central conformando una rueda; aparentemente, ambos lotes presentan las mismas características por lo que con este objetivo no fue posible decir que el Thelzán 101 haya provocado algún daño, así que las muestras fueron revisadas a un aumento mayor.

Las microfotografías muestran con mayor aumento una parte de las figuras anteriores donde se puede observar que las células hepáticas tienden a ser poligonales con una estructura bien definida dispuestas en láminas o trabéculas con una membrana nuclear bien definida, en ambos casos, el núcleo del hepatocito es redondo u ovoide, central, en general con cromatina dispersa teñida basofílicamente donde se pueden apreciar uno o dos nucleolos.

En ambos casos, el citoplasma es eosinófilo y abundante, ligeramente granular y en algunas zonas más claro debido a la conservación de glucógeno. Los sinusoides aparecen como regiones claras entre los cordones celulares y algunos de ellos se encuentran ocupados por eritrocitos los cuáles forman parte de la irrigación normal del hígado. También, podemos observar que en algunos hepatocitos existe la presencia de pequeñas vacuolas en el citoplasma junto a la membrana nuclear las cuales pensamos que habían sido provocadas por el Thelzán 101 como signo de daño citotóxico, pero al encontrar que dichas

vacuolas se encontraban sólo en ciertas zonas de la muestra y que además, también se encontraban en el lote control, pensamos que dichas vacuolas eran producto de una fijación incompleta y no debido a un daño provocado por Thelzán 101.

Finalmente, recurrimos a la microscopia electrónica de transmisión para poder determinar si el Thelzán 101 había provocado daño a nivel ultraestructural, por lo que primeramente se obtuvieron cortes semifinos como se observa en la figura 4 donde pudimos observar hepatocitos bien definidos con su núcleo bien definido y un citoplasma con pigmentación que probablemente corresponde a la presencia de glucógeno, como podemos observar, ambas muestras, tanto el control como el tratado, presentan características similares, y al observarlas al microscopio electrónico, pudimos observar que ambos lotes presentan un núcleo bien definido y presencia de mitocondrias con un aspecto normal y que son necesarias para la producción de energía así como también observamos el retículo endoplásmico rugoso que no presenta diferencias entre los diferentes lotes, en general, ambas muestras presenta características similares de un hepatocito normal, lo que significa que Thelzán 101 no provoca ningún daño a nivel hepático.

- ***Efecto regenerador de células  $\beta$  pancreáticas.***

Por otra parte, en el análisis histopatológico del páncreas tanto control como tratado, utilizando la técnica de Eosina-Hematoxilina que es una técnica rutinaria y que es ampliamente utilizada para los análisis histopatológicos, en nuestro caso la utilizamos simplemente para distinguir de forma muy general algunas partes del tejido pancreático, observamos que en la figura 5, con esta técnica no es posible detectar los diferentes tipos celulares que componen al islote de Langerhans, ni tampoco nos permitió detectar si existía alguna diferencia entre el lote control y el lote tratado con Thelzán 101, pero si nos ayudo a determinar que la porción exocrina del páncreas representa la mayor parte de la glándula como se muestra en la figura 4, y que dicha glándula está subdividida en lobulillos por tabiques de tejido conjuntivo.

Así mismo, podemos observar que en ambas muestras, lote control y tratado, los acinos se componen de varias células en su mayoría con forma piramidal y con un núcleo redondo y un citoplasma basal que es bastante homogéneo.

En cuanto a la porción endocrina del páncreas, esta tinción nos permitió identificar perfectamente pequeños cúmulos de células de diversos tamaños correspondientes a los islotes de Langerhans que como podemos observar, se encuentran ricamente irrigados por vasos sanguíneos en ocasiones engrosados por la presencia de eritrocitos. Además pudimos observar que dichos islotes se encuentran dispersos al azar entre los acinos.

Tanto en el lote control como en el tratado con Thelzán 101, observamos que poseen características similares y en ambos casos se encontraron islotes de Langerhans de diversos tamaños que no representa signo alguno de reconversión estructural del páncreas o regeneración celular.

Si bien cada islote consta de células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , sólo se pueden distinguir entre sí mediante tinciones especiales y puesto que uno de nuestros objetivos fue determinar la capacidad regeneradora de células  $\beta$  pancreáticas por la administración de Thelzán 101, recurrimos a la utilización de tinciones específicas de células  $\beta$  pancreáticas como fueron: la tinción de azul de toluidina, aldehído fucsina, tricrómica de Mallory y una variación de esta empleando Hematoxilina.

Recordemos que las células adultas del organismo se clasifican de acuerdo a su capacidad de dividirse por mitosis en: células lábiles, que son aquellas que muestran mitosis toda su vida (epidermis, mucosas, médula ósea, etc.); células estables, en donde las mitosis son ocasionales (hígado, riñón, páncreas, hueso, etc.); y células permanentes, que nunca muestran mitosis (sistema nervioso, músculo estriado, ojo, oído, etc.); en este caso donde estamos estudiando el páncreas pensamos que Thelzán 101 activaba esa mitosis provocando la proliferación de células  $\beta$  para que al ser incrementadas, la producción de insulina aumentara y los niveles de glucosa disminuyeran.<sup>35,37</sup>

Las tinciones especiales para células  $\beta$  nos permitieron determinar si en los animales tratados con Thelzán 101 se encontraba una mayor cantidad de células  $\beta$  que en el lote control y como podemos observar en la figura 6 donde se utilizó la tinción de azul de toluidina, se identifica perfectamente el islote de Langerhans el cual se encuentra delimitado de los acines pancreáticos que fueron teñidos de un color azul más intenso; que si bien en esta figura no se percibe alguna diferencia muy marcada, al utilizar un objetivo mayor como se muestra en la figura 7, comenzamos a observar ciertas diferencias entre un lote y otro; podemos observar la existencia de cierta pigmentación violeta-rojiza la cuál es característica de las células  $\beta$  pancreáticas y observamos que existe una mayor pigmentación en el lote tratado que en el control, pero existen áreas donde no existe pigmentación debido probablemente a que en esas zonas, las células fueron teñidas de forma muy tenue por lo que no se alcanzan a distinguir así que recurrimos a otra técnica que nos ayudara a identificar de manera más precisa las células  $\beta$  pancreáticas.

Posteriormente, empleamos la tinción de aldehído fucsina con la cuál, las células  $\beta$  pancreáticas se tiñen de un color violeta intenso aunque no permite distinguir sus núcleos, como podemos observar en la figura 8, los acines pancreáticos se tiñeron de un color rosa mientras que el islote pancreático presenta zonas rosadas y zonas teñidas de violeta intenso, en esta imagen pudimos distinguir que en cuanto a presencia de color violeta, el lote tratado con Thelzán 101 presenta una coloración intensa y que se encuentra cubriendo gran parte de la porción interna del islote, mientras que en el lote control, podemos observar que si bien la presencia de color violeta se hace presente en gran cantidad, es menor que la que se encuentra en el lote tratado además de que dicha coloración no se encuentra la mayor concentración en la parte interior del islote que es donde se encuentra la mayor parte de las células  $\beta$  pancreáticas.

Esta técnica nos permitió de igual forma identificar algunas células  $\alpha$  pancreáticas las cuales presentan una ligera pigmentación rojiza como se puede observar en la figura 9, y también podemos ver la coloración violeta intensa correspondiente a las células  $\beta$  pancreáticas.

Posteriormente utilizamos una variante de la técnica de tricrómica de Mallory empleando Hematoxilina para poder observar si nos ayudaba a una mejor identificación de células  $\beta$  pancreáticas y como podemos observar en la figura 10, observamos que en este aumento se observa en el islote de Langerhans, la tinción de núcleos pertenecientes a células  $\beta$  pancreáticas pero también a células  $\alpha$  que sólo se podían diferenciar mediante la presencia de gránulos rojizos en estas últimas por lo que recurrimos a un mayor aumento como se observa en la figura 11 donde podemos observar que existen zonas que presentan pigmentaciones rojizas correspondientes a las células  $\alpha$ ; pero no nos ayudó a determinar si existía alguna diferencia entre los dos islotes en cuanto a células  $\beta$ , ya que se contaba con islotes que variaban mucho en tamaño, ni siquiera con la utilización de hematoxilina obtuvimos una tinción funcional para nuestro propósito.

Finalmente, dentro de estas tinciones especiales, empleamos la técnica que en histopatología se considera como la más específica para la identificación de células  $\beta$  pancreáticas que es la tinción tricromica de Mallory; como podemos observar en la figura 12, esta técnica tiñe el islote de Langerhans de color violeta-rojizo donde se observa que el tamaño de los islotes tanto en el lote control como en el tratado, es muy similar así como su forma y que contienen ciertas granulaciones, algunas de ellas correspondientes a las células  $\beta$  pancreáticas que fue posible distinguir las hasta emplear un aumento mayor como se observa en la figura 13 donde podemos observar claramente granulaciones de color violeta-azul que corresponden a las células  $\beta$  pancreáticas y claramente se observa que en el lote tratado se encuentran una mayor cantidad de granulaciones que en el lote control, lo que nos hizo pensar que verdaderamente el compuesto Thelzán 101 provocaba un cambio estructural en células  $\beta$  pancreáticas con lo que se obtenía una regeneración celular, probablemente mediante el estímulo de la mitosis, y así la obtención de una mayor cantidad de células  $\beta$  pancreáticas para una mayor producción de insulina.

Para confirmar estos resultados obtenidos en la histopatología, recurrimos a la observación ultraestructural del tejido pancreático, tanto de la parte endocrina como la exocrina; observándose que la parte exocrina del lote control se observa un núcleo bien definido, mientras que en el citoplasma, se observaron gránulos de diversos tamaños probablemente de zimógeno y una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso de aspecto normal; mientras que en el lote tratado con Thelzán 101, observamos una célula con un núcleo bien definido, así como una gran cantidad de gránulos probablemente de zimógeno y gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso, el cuál estaba dilatado signo probablemente debido a la administración de Thelzán 101, muchas veces la dilatación del retículo endoplásmico rugoso da como resultado una mayor producción de alguna sustancia, en este caso, desconocemos que pudo provocar la dilatación del retículo, por lo que sería interesante en posteriores estudios poner cierta atención a la parte exocrina del páncreas.

Finalmente, al revisar la porción endocrina del páncreas encontramos que el islote pancreático presenta gránulos electrodensos característicos, una poca presencia de mitocondrias con una estructura normal y el retículo endoplásmico rugoso que se encuentra ligeramente compacto, características normales de un islote estructuralmente sano y característico. Mientras que en el lote control, observamos una gran pérdida de gránulos electrodensos, sugiriendo que podría estar asociado al tratamiento con Thelzán 101 provocando así la reconversión celular para de esta forma dar lugar a la formación de nuevos islotes conteniendo células  $\beta$  pancreáticas y como consecuencia una mayor producción de insulina y un descenso en los niveles de glucosa plasmática.

## VIII . CONCLUSIONES.

- ❖ La determinación de la dosis letal 50 (DL50) del compuesto Thelzán 101 nos permitió establecer su grado de toxicidad con lo que podemos concluir que es un compuesto ampliamente seguro siempre y cuando se siga la dosis establecida.
- ❖ El compuesto Thelzán 101 posee cierta capacidad hipoglucemiante la cuál es directamente proporcional a la dosis administrada y dicha hipoglucemia se mantiene constante mientras se siga administrando el compuesto Thelzán 101.
- ❖ El compuesto Thelzán 101 no provoca daño hepático macroscópico, ni ultraestructural ya que en las laminillas observadas tanto de ratas control como tratadas, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes lotes.
- ❖ La administración del compuesto Thelzán 101 provoca una modificación ultraestructural de células  $\beta$  pancreáticas lo que da como resultado una mayor cantidad de estas células, por lo que podemos decir que el compuesto Thelzán 101 posee características proliferativas de células  $\beta$  pancreáticas.
- ❖ La administración del compuesto Thelzán 101 provoca que la masa corporal de los animales disminuya, sin embargo, dicha disminución no es constante.

## IX. REFERENCIAS

1. Actualización de la “Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2- 1994, Para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes.” (22)
2. Alarcón Segovia, Donato.- “Hígado y Vías Biliares”.- Ed. UNAM.- México.- 1968.- p.p. 10-15 (9)
3. Alpízar Salazar, Melchor.- “Guía Para el Manejo del Paciente Diabético”.- Ed. El Manual Moderno.- México.- 2001.- p.p. 5-71, 165-245. (34)
4. Ámbito Farmacéutico, Fitoterapia.- vol. 24.- número 8.- septiembre 2005. (44)
5. Arno AG, Nadal JF, Cases MM y col. Criterios y pautas de terapia combinada en la diabetes tipo 2. Documento de consenso de la Sociedad Española de Diabetes y de la Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria. Endocrinología y nutrición 2001; 48 (3): 82-97. (28)
6. Atlas de la Diabetes. Federación Internacional de Diabetes. [www.eatlas.idf.org](http://www.eatlas.idf.org) (43)
7. Bauer, John D.- “Análisis Clínicos, Métodos e Interpretación”.- Ed. Reverte.- Barcelona, España.- 1986.- p.p. 517-534. (18)
8. Beeson, Pad B.- “Textbook of Medicine”.- Ed. Nueva Editorial Interamericana.- 13ra. ed.- México.- 1975.- p.p. 1599-1618. (12)
9. Berkow, Robert.- “El Manual Merck”.- Ed. Interamericana.- 7ma. ed.- México, D.F.- 1986.- p.p. 954-969. (8)
10. Betteridge, John.- “Case Studies in Diabetes”.- Ed. Martín Dunitz.- Inglaterra.- 2003.- p.p. 33-59, 83-101. (37)
11. Cormack, David H.- “Histología de Ham”.- Ed. Harla.- 9na. ed.- México.- 1988.- p.p. 639-659. (1)
12. Chandrasoma, Parakrama.- “Patología General”.- Ed. El Manual Moderno.- 3ra. ed.- México.- 1995.- p.p. 703-723. (3)
13. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.- 1998. (20)
14. Domarus, A.V.- “Medicina Interna”.- Ed. Marin.- 9na. ed.- México.- 1978.- Tomo II.- p.p. 479-500. (6)
15. Drury, Paul.- “Diabetes: Your Questions Answered”.- Ed. Churchill Livingstone.- Toronto, Canada.- 2005.- p.p. 25-161. (36)

16. Economic consequences of epidemiological changes in diabetes in middle income countries: the mexican case. (Arredondo. Diabetes Care 27, 1. 2004). (42)
17. Estadísticas Vitales Capítulo Mortalidad INEGI/DGEI, 1998. (23)
18. Gartner, Leslie P.- “Atlas Color Histología”.- Ed. Médica Panamericana.- 3ra. ed.- Buenos Aires, Argentina.- 2003.- p.p. 301-309. (5)
19. Goodman, Louis S.- “Bases Farmacológicas de la Terapéutica”.- Ed. Interamericana.- 5ta.ed.- México.- 1978.- p.p.1281-1287. (10)
20. Grainger Bisset, Norman.- “Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals”.- Ed. CRC Press.- 2ª. ed.- Londres.- 2001.- p.p. 348-352. (30)
21. Guyton, Arthur C.- “Tratado de Fisiología Médica”.- Ed. Interamericana.- 5ta. ed.- México.- 1984.- p.p. 962-964, 1143-1146. (15)
22. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996: vol 2: 1603-1607. (25)
23. Harrison, Tinsley Randolph.- “Medicina Interna”.- Ed. La Prensa Médica Mexicana.- 4ta. ed.- México.- 1976.- p.p. 426-434. (14)
24. Krupp, A. Markus.- “Diagnóstico Clínico y Tratamiento”.- Ed. El Manual Moderno.- 23ra. ed.- México.- 1985.- p.p. 767-798. (13)
25. Latorjet, Michel.- “Anatomía Humana”.- Ed. Médica Panamericana”.- 4ta. ed.- Buenos Aires, Argentina.- 2005.- p.p. 1366-1400, 1410-1420. (17)
26. Litter, Manuel.- “ Compendio de Farmacología “.- 4ta. ed.- Ed. Librería el Ateneo.- Buenos Aires, Argentina.- 1988. p.p. 236-253. (19)
27. Lynch, Mathew.- “Métodos de Laboratorio”.- Ed. Nueva Editorial Interamericana.- 2ª.ed.- México.- 1972.- p.p. 197-199, 427-434. (39)
28. Malgor LA, Valsecia ME. Farmacología de la diabetes. En: Malgor LA, Valsecia ME. Farmacología médica. 2ª ed. Corrientes: Ediciones Donato/FARM,1995: vol 2: 174-191. (26)
29. Manchair, Ebadi.- “Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine”.- Ed- CRC Press.- London.- 2002.- p.p. 447-456. (31)
30. Manual Merck Sharp & Dohme Cap. 13 seccion 147, 2005 (47)

31. Martí ML. Historia de la diabetes. En: Ruiz M. Diabetes melitus. 2ª ed., reimpresión actualizada. Asunción: Editorial Akadia, 1999: 1-6. (27)
32. Mc Phoe, Stephen J.- “Fisiopatología Médica: Una Introducción a la Medicina Clínica”.- Ed. El Manual Moderno.- 4ta. ed.- México.- 2003.- p.p. 533-563. (2)
33. Nature 2001;409:307-312 (45)
34. Ozcan, Sabine.- “Diabetes Mellitus: Methods and Protocols”.- Ed. Humana Press.- New Jersey, USA.- 2003.- p.p. 3-51. (35)
35. Pardo, F. J.- “Anatomía Patológica”.- Ed. Mosby.- Madrid.- 1997.- p.p. 730-731, 779-794. (38)
36. Pérez Tamayo, Ruy.- “Patología Molecular, Subcelular y Celular”.- Ed. Prensa Médica Mexicana.- México.- 1975.- p.p. 143-149. (4)
37. Pérez Tamayo, Ruy.- “Principios de Patología”.- Ed. La Prensa Médica Mexicana.- 2ª.ed.- México.- 1965.- p.p. 314-315. (40)
38. Phelig, Philip.- “Endocrinología y Metabolismo”.- Ed. El Manual Moreno.- México, 2003.-p.p 342-423. (33)
39. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.- Vol. 38.- Número 3.- Julio-Septiembre 2007.(46)
40. Robbins, Stanley L.- “Basic Pathology”.- Ed. Interamericana.- Toronto, Canadá.- 1971.- p.p.189-201. (11)
41. Robins, Stanley.- “Patología Estructural y Funcional”.- Ed. Interamericana.- México.- 1975.- p.p. 1020-1038. (41)
42. Ruiz M, Giannaula CH, Matrone A, Fraschini JJ. Tratamiento de la diabetes. Hipoglucemiantes orales. En: Ruiz M. Diabetes melitus. 2ª ed., reimpresión actualizada. Asunción: Editorial Akadia, 1999: 294-303. (24)
43. Santillán S. Cristina , Trabajo de Seminario “ Revisión Bibliográfica de la Farmacoterapia en Pacientes Diabéticos “ , México, 1998. (21)
44. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2000; 23: S4-S19. (48)
45. Tierney, Lawrence M.- “Diagnóstico Clínico y Tratamiento”.- Ed. El Manual Moderno.- 38va. ed.- México.- 2003.- p.p. 1049-1065, 1171-1180. (7)

46. Vademecum del CGCOF. 2005. (29)
47. Vagaban, N.V.- “Bioquímica”.- Ed. Interamericana.- 2da. Ed.- México, D.F.- 1984.- p.p. 259-265. (16)
48. Vanaclocha, Bernat.- “Fitoterapia: Vademecum de Prescripción”.- Ed. Masson.- 4ª. ed.- México.- 2003.- p.p. 13-26. (32)
49. [http://www.renal.org.ar/revista/Vol24/1/24\\_1\\_189.html](http://www.renal.org.ar/revista/Vol24/1/24_1_189.html)
50. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/DM-2.html>
51. <http://www.monografias.com/trabajos14/dosis-letal/dosis-letal.html>
52. [http://www2.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica\\_ambiental/T1.html](http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/T1.html)