



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA-U.N.A.M.
CARRERA DE BIOLOGIA

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION PARCIAL DE UN
PRINCIPIO ACTIVO HIPOGLUCEMIANTE DE LA
PLANTA Salpianthus arenarius.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A N

CARDENAS QUINTANILLA MA. DE JESUS

HERNANDEZ DELGADO CLAUDIA TZASNA





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.

Ocurre que la realidad es superior a los sueños. En vez de pedir "dejame soñar", se debería decir: "dejame mirar".

Juega uno a vivir.

JAIME SABINES.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE), de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, - U. N. A. M. bajo la dirección de la Q. F. I. Rosa Martha Pérez Gutiérrez, a quien agradecemos la conducción de esta investigación.

Con el más sincero agradecimiento
a los integrantes del Laboratorio
de Investigación de Productos Na-
turales, así como a maestros, com-
pañeros, amigos y a todos aque--
llos que colaboraron en la reali-
zación de esta Tesis, muy en espe-
cial a los Biólogos:

Germán Yescas Laguna
Rubén Osnaya Mendoza

Con nuestro respeto y profunda admiración al

I. B. Q. Abel Fuentes Toledo

por su valiosa amistad.

A la memoria de mi Padre:

Ing. Ariosto Hernández Arce.

A mi gran amiga y compañera de siempre:

MI MADRE: Vida Delgado Rojas.

A mis Hermanos:

Cesar, Xanat, Juan y Ariosto.

A toda mi familia, en especial a mis Tías:

Concepción Rojas y Armonía Delgado.

A mi amiga:

Blanca Arias.

A mis Padres, a quien todo debo:

María de Jesús Cárdenas de Q.

Manuel Cárdenas Ortiz.

A la mujer que más admiro:

MI MADRE.

A todos mis Hermanos.

A mi Familia.

... Recordar las cosas que se han ido
es, en definitiva, una manera de retener
algo de ellas y eso, quizá, rescata un
poco la alegría pasada

PABLO NERUDA.

A nuestras amigas Ena y Elisa:

Por su buen humor que hicieron a-
menas muchas clases (Genética).

A nuestros "Hermanitos" consentidos:

Rene y Ervin.

A Gerardo, Hector, Victor, David y Cuper:

Por los buenos momentos que pasa-
mos juntos.

Con cariño y agradecimiento a:

Al compadre de Rubén (German)

CON CARIÑO Y AGRADECIMIENTO AL "NINO".

... Iremos, yo, tus ojos y yo,
mientras descansas,
bajo los tersos
 párpados vacíos,
a cazar puentes,
puentes como liebres,
por los campos
del tiempo que vivimos ...

CON CARÍO.

... Yo voy soñando caminos
de la tarde. !Las colinas
doradas, los verdes pinos,
las polvorientas encinas!
¿A dónde el camino irá? ...

ANTONIO MACHADO.

CONTENIDO

| | | |
|-----|---|------|
| I | RESUMEN ----- | 1 ✓ |
| II | INTRODUCCION ----- | 2 |
| III | ANTECEDENTES ----- | 4 |
| | 1. Breve Historia de la Diabetes ----- | 4 |
| | 2. Anatomía e Histología del Páncreas ----- | 11 |
| | 3. Insulina ----- | 19 |
| | 3.1 Química ----- | 19 |
| | 3.2 Biosíntesis ----- | 22 |
| | 3.3 Secreción ----- | 27 |
| | 3.4 Mecanismo de Acción ----- | 34 |
| | 3.5 Metabolismo de la Insulina ----- | 41 |
| | 4. Diabetes: Definición y Trastornos en el Metabolismo ----- | 42 |
| | 4.1 Definición ----- | 42 |
| | 4.2 Trastornos en el Metabolismo ----- | 42 |
| | 5. Terapéutica y Tratamiento de la Enfermedad -- | 46 |
| | 5.1 Insulinas ----- | 47 |
| | 5.2 Hipoglucemiantes Orales ----- | 55 |
| | 5.2.1. Sulfonilureas ----- | 56 |
| | 5.2.2. Biguanidas ----- | 58 |
| | 6. Etnofarmacología en México ----- | 61 |
| | 7. Objetivos ----- | 63 |
| IV | PARTE EXPERIMENTAL ----- | 64 ✓ |
| | 1. Diagrama de Investigación ----- | 64 ✓ |
| | 2. Material y Método ----- | 65 ✓ |
| | 2.1 Inducción a la Diabetes por medio de Aloxana ----- | 65 ✓ |
| | 2.2 Determinación de Glucosa en Sangre - | 65 ✓ |

| | | |
|------|------------------------------------|----|
| 2.3 | Administración del Problema ----- | 67 |
| 2.4 | Diagrama de Flujo ----- | 68 |
| 2.5 | Colecta y Secado ----- | 69 |
| 2.6 | Aislamiento del Problema ----- | 69 |
| 2.7 | Separación Cromatográfica ----- | 70 |
| 2.8 | Purificación ----- | 70 |
| 2.9 | Elucidación de la Estructura ----- | 71 |
| V | RESULTADOS ----- | 72 |
| | 1. Bioensayos ----- | 72 |
| | 2. Parte Química ----- | 81 |
| VI | DISCUSION ----- | 85 |
| VII | CONCLUSIONES ----- | 87 |
| VIII | BIBLIOGRAFIA ----- | 90 |

I RESUMEN

De la planta Salpianthus arenarius, se aisló un hipoglucemiante; esta actividad se comprobó mediante bioensayos en cada una de las fases de separación, utilizando el análisis de varianza para el tratamiento estadístico de los resultados. El aislamiento del compuesto se hizo de acuerdo a sus propiedades de solubilidad y por técnicas cromatográficas, la elucidación de la estructura se determinó por análisis espectroscópicos.

I I INTRODUCCION

El estado actual de México se refleja en muchos aspectos de nuestra sociedad, una dependencia hacia los países desarrollados, no solo económica, sino también científica y tecnológica; es por eso que se debe de hacer algo para solucionar este problema.

Dentro de los daños a la salud la Diabetes Mellitus es una enfermedad que es un serio problema de salud pública. Durante 1975 la Diabetes M. en México ocupaba en décimo lugar como enfermedad causante de muerte, siendo el 2.4 % de las defunciones totales de ese año las causadas por esta enfermedad.

En los últimos años la incidencia de Diabetes ha aumentado, así en 1980 murieron a causa de este mal 14,626 personas ocupando el séptimo lugar como causa de defunciones (26).

El tratamiento de esta enfermedad se ha restringido a la dieta, al uso de insulina o de hipoglucemiantes orales (biguanidas y sulfonilureas). En algunos casos el tratamiento con estos agentes es exitoso; sin embargo, el índice de mortalidad a causa de esta enfermedad sigue en aumento.

La atención de la salud en la República Mexicana se enfrenta a un gran conflicto que es el resultado de la dependencia relacionada con la industria farmacéutica, ya que la mayoría de los laboratorios productores de medicamentos en nuestro país pertenecen a empresas transnacionales, por lo tanto, casi la totalidad de las formulaciones y las patentes de los fármacos proceden del exterior.

Es por esto que la investigación en el campo farmacéutico debe impulsarse, pero tomando como base los elementos que nuestro país posee y que pueden ayudar al desarrollo de una industria netamente nacional. Esta búsqueda de soluciones cuenta con una base que se ha consolidado con el paso del tiempo; que en ocasiones es olvidada por unos, desconocida por muy pocos y despreciada por muchos, esta base es la medicina tradicional o herbolaria, medicina que es parte de nuestra cultura, que se basa en la fitoterapéutica. Tomando en cuenta que el 60 % de los medicamentos

de patente son de origen vegetal, se puede deducir que el retomar a la herbolaria como solución, es buena opción.

Durante la elaboración de este trabajo, fué posible observar el amplio campo de investigación que se encuentra frente a nosotros, como un gigante dormido, apacible, pero presente en espera de ser despertado para aportar toda su capacidad en beneficio de la salud y economía del mexicano, la herbolaria mexicana es tan amplia y variada, que se pueden encontrar plantas para el tratamiento de casi todo tipo de enfermedades, y en este caso específicamente de la DIABETES.

III ANTECEDENTES

1. Historia de la Diabetes.

"La historia de la diabetes es sin duda uno de los capítulos más fascinantes de la historia de la medicina. En ella se observa como el error y el éxito, las falsas conclusiones y las observaciones exactas, el azar y los trabajos programados de investigación, se conjuntaron para llegar, si no a eliminar por completo una calamidad de la humanidad, tan antigua como el hombre mismo, si al menos desde el descubrimiento de la insulina, a quitarle su carácter temible. Y con el advenimiento de los hipoglucemiantes orales facilitarle al paciente un método más cómodo para lograr su control.

La diabetes ya no significa hoy una condena a muerte, pero a pesar de esto, no ha disminuido el número de problemas a resolver." (Dr. (Peniche, F. M. 1979).

La primera descripción de la enfermedad la encontramos en el papiro de Ebers que data aproximadamente del año 1500 A. de C. fué redactado en el período que media entre la llegada de los Hebreos a Egipto y su éxodo. En este papiro se habla ya de un tratamiento de la poliuria, síntoma principal de la diabetes o como ellos la denominaban "inundación de orina". La terapia consistía en: hueso, granos de trigo, papilla de cebada recién preparada, tierra verde de plomo y agua; esta mezcla la dejaban reposar en estado húmedo durante la noche, al rocío; al día siguiente la colaban y esa agua se tomaba durante cuatro días. Resulta asombroso que a pesar de los numerosos conocimientos medievales sobre la uroscopía, que enseñaban al médico no sólo a mirar la orina sino también a probarla, no se conociera en el mundo Griego, ni en el Egipto ni mucho menos en el mundo de Europa Occidental, un hallazgo que consta ya en la literatura sánscrita de la antigua India: el sabor dulce de la orina, aunado a la cantidad, se debe a tres grandes médicos Hindúes: Caraca, Susrutta, Vaghata, y la descripción de la emisión patológica de orina, distinguiéndose las siguientes modalidades:

- Ikshumeha = Orina con sabor a caña de azúcar.
 Madhumeha = Orina con sabor a miel
 Hastimeha = Cantidad enorme de orina como elefante en celo.

como concepto médico, la diabetes surge ya en el siglo III A. de C., en los escritos de Demetrio de Apamea (270 A. de C.) creador del término "Diabetes".

Los escritos de este autor desgraciadamente están perdidos pero por Celio Aureliano, médico británico del siglo V ó VI, conocemos el término diabetes empleado por Demetrio de Apamea para designar aquellas formas de hidropesía en que el agua sin formar edemas, fluye a través del cuerpo como si fuera caño.

Celso (25 A. de C. - 50 D. de C.) en su obra "De Medicina" señaló por vez primera, que en la terapia de esta enfermedad era necesario someter a los pacientes a una dieta y a un trabajo muscular.

A Areteo de Capadocia, que vivió en Asia Menor en el siglo II de nuestra era, se le debe la más bella y exacta descripción de la diabetes, quien la llamaba "enfermedad enigmática y rara", y la describió de la siguiente manera: "Los enfermos tienen una sed insaciable y, sin embargo, eliminan más orina que líquido beben. Pues carne y hueso se funden en orina. La consunción aumenta rápidamente y tras una vida miserable y dolorosa proviene rauda la muerte".

Galeno (129 - 199) creía que la diabetes era una afección renal, en la cual los riñones están inflamados y la orina no es otra cosa, que la bebida eliminada tal y como fue ingerida, estos conceptos están en su obra "Principes Medicorum".

Paracelso (1493 - 1566) consideró como causa de la diabetes la presencia de una sal seca - "La que se adhiere al riñón como un tartaro al tonel, la diabetes no es otra cosa que un exceso de orina y ganas de orinar debido a un exceso de calor en los riñones".

Franz de Le Boe (1614 - 1672), profesor de Leyden fue el primero en suponer que el páncreas cede un jugo al intestino, donde se mezcla con los alimentos. Afirmó que la causa de la diabetes no se encontraba en los riñones, sino en la sangre.

Thomas Willis (1621 - 1675), médico de la Cámara de Carlos II de Inglaterra, señala que es un padecimiento "Dispuesto a la buena vida y a beber mucho vino sin diluir," la orina de estos enfermos es maravillosamente dulce, como embebida de azúcar ó miel".

A pesar de sus estudios no pudo concebir su origen, sino que influenciado por el pensamiento alquimista de su época, considero el sabor dulce como el producto de una mezcla de sales y azufre en la sangre.

Johann Conrad Brunner (1653 - 1727), médico en Dusseldorf y después en Heidelberg, logró en los años 1677 a 1682 provocar los síntomas típicos de la diabetes extirpando el páncreas de perros. Sin embargo, por haber dejado una pequeña parte de la porción duodenal, los animales se repusieron pronto. Brunner no reconoció la importancia de los síntomas por él observados y por la afirmación de que el páncreas no era un órgano vital, bloqueó la investigación de la diabetes por 150 años.

Con John Rollo y Johann Peter Frank a fines del siglo XVIII se introduce en el léxico médico el calificativo de Mellitus a la diabetes.

William Cullery (1712 - 1790), establece la diferencia entre diabetes mellitus y diabetes insípida.

Matthaeus Dobson, en 1777, demostró la presencia de azúcar en la orina y en el suero. Por sus observaciones llegó a la conclusión de que la diabetes se caracterizaba por un debilitamiento de las fuerzas para desdoblar el azúcar.

De esta forma y por primera vez se menciona un metabolismo alterado de los carbohidratos.

En 1815, Chevereul descubrió que el azúcar mencionado por Dobson en el año de 1777 se presentaba en forma de glucosa.

Posteriormente Claudio Bernard (1813 - 1878), descubrió que en el hígado se almacenaba azúcar en forma parecida al almidón, es decir, glucógeno y constató que de ser necesario, esta sustancia se transforma nuevamente en azúcar y pasaba a la sangre, también realizó ligaduras del páncreas que suspendieran la producción exocrina. Señaló también la relación entre la diabe-

tes y el sistema nervioso central; con sus estudios y resultados - proporcionó un avance importante en el conocimiento de la diabetes mellitus.

En el año de 1869, Paul Langerhans, descubrió en el páncreas acumulaciones de células en forma de "islotes" que se distinguían de las otras estructuras celulares, más sin embargo, su funcionamiento se desconocía.

Transcurrieron varios años hasta que el 8 de junio de 1889, en la revista *Klinische Medizin*; D. Minkowski y J. V. Mering publicaron sus experiencias en relación al hecho de que extirpando el páncreas de perros, éstos acusaban síntomas típicos de diabetes.

Así se inauguró una nueva era en la Diabetología, pues a partir de ese momento, todo el interés se concentró más en el páncreas.

Minkowski en Estambul y como cosa casual Hédom en Montpellier en el año de 1892, publicaron independientemente el hecho de que la diabetes podía ser evitada o eliminada por la implantación de fragmentos de páncreas bajo la piel.

En 1904, E. E. Sterling, formuló el concepto de la hormona y cundió en el mundo científico la convicción de que había de hallarse una sustancia de este tipo para el tratamiento de la diabetes pancreática.

El investigador Belga Jean Von Moyer en 1909, propuso para esta sustancia hipotética el nombre de insulina, mucho antes de su descubrimiento, término que popularizó el profesor Scheafer en 1916.

En la década de 1910, el doctor Georg Laudwing Zulzer, se dedicó a preparar extractos alcohólicos del páncreas con los que obtuvo un preparado ampliamente purificado, para su época, el cual fue patentado en Estados Unidos en 1912. Con este extracto se logró obtener una mejoría asombrosa en los pacientes diabéticos - pero éstos se vieron seguidos de efectos secundarios graves con hipoglucemias y efectos tóxicos, alérgicos, por lo cual Zulzer desistió de continuar sus trabajos.

30 años más tarde, de los experimentos de Minkowski y Mering, y basados en ellos, Federic Grant Hanting, concibió la idea de ligar el conducto pancreático de perros, esperar de 6 a 8 se-

manas para lograr una degeneración del órgano, extirpando lo que quedaba de él y preparar extractos. Debido a que el doctor Hanting no tenía experiencia en química, siguiendo el consejo del doctor John James Richard Macleod, empleó como colaborador al estudiante de medicina Charles H. Best, poco después se le unió el químico Jaime Beltran Collip., quien se dedicó a preparar extractos pancreáticos, logrando un precipitado con alcohol, casi libre de proteínas nocivas y alergizantes, denominandola isletina que a instancias de Macleod se sustituyó por el de insulina, término acuñado en 1909 por Meyer.

La primera aplicación de la insulina a humanos fue en un paciente diabético juvenil de 14 años de edad, el 11 de enero de 1922, en el Hospital General de Toronto y posteriormente, a una enfermera, siempre con el mejor éxito.

En Boston, el doctor Elliot P. Joslin fue uno de los primeros médicos que ensayaron clínicamente la insulina y a él se deben los lineamientos de la dosificación. Inició sus experimentos el 7 de agosto de 1922.

En 1924, John Jacob Abel, químico que trabajaba en la Universidad John Hopkins, que casi descubre la adrenalina, consiguió obtener la insulina cristalina pura.

Investigadores Daneses introdujeron la protamina-insulina y en 1937 la protamina-zinc-insulina, I; la insulina globina en 1939 y la NPH en 1950; el grupo de las insulinas ultralentas nació en 1954.

Después del descubrimiento de la insulina fue necesario que transcurrieran 34 años para que F. Sanger en 1955, publicara la fórmula estructural de la insulina bobina, lo que le valió el premio nobel de química en 1958.

Casi tan emocionante como el descubrimiento de la insulina, fue el de los antidiabéticos orales. En 1918, el investigador -- Japonés C. K. Watanabe, observó que los preparados de guanidina producían un descenso de la glucemia en los cobayos, pero éstos preparados producían efectos secundarios a nivel neurológico y gástrico.

En 1929 se sintetizaron las biguanidas cuyas propiedades -

hipoglucemiantes fueron descritas por Hesse y Taubmann pero sin comprobación a nivel clínico.

Las investigaciones en este terreno terapéutico de la diabetes se suspendieron durante las fases prebélicas y bélicas de la Segunda Guerra Mundial, para posteriormente lograr mejores compuestos biguanídicos como son: Buformin, Fenformin y Metformin actualmente en uso.

Savagnome, en 1941, demostró el efecto hipoglucemiante de las sulfamidas.

En 1942, el internista doctor M. Janbon observó en sus pacientes después de la administración de una sulfonamida la IPTD (P-amino-Benceno-sulfamida-isopropiltiodiazol) ensayada por Von Kennel y Kimming reacciones hipoglucemiantes graves, incluso mortales (dos pacientes). A. Loubatiers, se dedicó en los siguientes años a la investigación de esta sustancia en experiencias con animales. Los resultados de sus investigaciones los publicó en 1946 en su tesis Doctoral.

En los inicios del año 1954, los doctores J. Franke y J. Fuchs, ensayaban con una nueva sulfonamida constituida por una sulfonilurea denominada experimentalmente Bz-55 y genericamente como Carbutamida. Notaron que producía varios efectos indeseables, por lo cual el Dr. Fuchs se la autoadministró y comprobó que se presentaba un cansancio notable, sudoración, sensación de hambre temblores y cierta euforia, esto aunado a un descenso de la glucosa determinados en pruebas de laboratorio. Este descubrimiento lo publicaron bajo el título de "Un Nuevo Principio Antidiabético".

Así pues, el efecto secundario de una sulfamida y el autoensayo de un médico capaz de interpretarlo correctamente y deducir las consecuencias adecuadas, condujeron a conocer como antidiabético un nuevo grupo de medicamentos, las sulfonilureas hipoglucemiantes.

En 1955, los investigadores Farbwerke Hoechst, AG y -- Boehringer Mannheim Gmb-H publicaron el descubrimiento de otro fármaco hipoglucemiante de la misma familia de la carbutamida al que llamaron D-850, que más tarde se conociera con el nombre de Tolbutamida.

En el año de 1958, aparecieron la cloropropamida, la acetohexamida y la tolazamida.

En 1969, apareció la glibenclamida O.H.B. - 419, (Farbwerke Koechst AG y Boehringer Mannheim GmbH), que se distingue por ser eficaz y segura y ser el primer hipoglucemiante oral, con una dosificación muy baja en miligramos. En 1971 apareció otra sulfonilurea: la glibornurida.

Según parece en México no hay datos de la existencia de este padecimiento en la época Precortesiana lo cual no invalida el hecho de que si hubiera pacientes con este padecimiento.

Una de las primeras noticias de esta enfermedad se remonta al año de 1836, cuando el Dr. Schiede expone su experiencia con el uso del "Creosote" en la curación de la diabetes, experiencia que es publicada en la revista de la Academia Nacional de Medicina en el Vol. 1 pag. 75. Años más tarde en 1840 aparecen publicados en el Vol. 4 pag. 316 de la misma revista los resultados de la investigación de Bouchardat sobre la naturaleza y tratamiento de la diabetes comentados en la Academia Nacional de Medicina por el Dr. Andrade.

Los Drs. Guillermo Parra y Fernando Ortega, editaron en 1893 el "Formulario de la Facultad Médica Mexicana" donde se recopilan más de 1,500 fórmulas y tratamientos para diversas enfermedades, entre ellas la diabetes, la cual era tratada de diversas formas, como por ejemplo:

El Dr. E. Lier, recomendaba 0.03 gr. de codeína tres veces al día durante diez días, para luego aumentar a 0.05 gr. por tiempo indefinido.

En 1927, el Dr. Francisco de la P. Miranda presentó un trabajo titulado "Indicaciones para el Tratamiento de la Diabetes con Insulina", relatando un caso de glucosuria de 600 gr. en 24 horas que logró controlar con 20 unidades de insulina 3 veces al día.

Una de las primeras publicaciones mexicanas sobre el uso de hipoglucemiantes orales se deben a los Drs. Salvador Suviran, Luis Domenge y a la QFB Isabel Escobar, quienes publicaron sus experiencias con 30 pacientes diabéticos tratados con carbutamidas y tolbutamida. (49), (70).

2. Anatomía e Histología del Páncreas.

El páncreas es una glándula exocrina y endocrina, es un órgano blando, carnoso, color gris rojizo o amarillento, con muy poco tejido conectivo, que se compone de cabeza, cuerpo y cola. A la unión de la cabeza y el cuerpo se le llama cuello. La vena mesentérica superior termina cuando establece unión con la vena esplénica para de este modo formar la vena porta, por detrás del cuello. El peso medio de la glándula es aproximadamente de 90 gr en el varón y de 85 gr. en la mujer. Mide aproximadamente 12.5 cm de largo y 5 cm. de ancho.

La cabeza se halla enmarcada por la curva duodenal y se le yuxtapone por delante la región pilórica del estómago y la primera porción del duodeno. El coledoco desciende por detrás de la primera porción del duodeno, primeramente dorsal a la cabeza del páncreas, pero antes de penetrar en el duodeno, penetra en el seno del páncreas.

Los arcos pancreaticoduodenales se hallan situados por delante y por detrás de la cabeza del páncreas, parcialmente incluidos en ella. El proceso uncinado es una prolongación de la parte inferior e izquierda de la cabeza y se proyecta hacia arriba y a la izquierda, por detrás de los vasos mesentéricos superiores. La vena mesentérica superior, que se halla a la derecha de la arteria, pasa por la escotadura pancreática formada por este proceso.

El cuerpo y la cola del páncreas se extienden hacia la izquierda cruzando la columna vertebral. La cola se prolonga en el ligamento esplenorrenal, donde entra en contacto con el bazo. El cuerpo, situado inmediatamente bajo el tronco celiaco y encima de la flexura duodenoyeyunal, es de forma ligeramente prismática tiene tres caras: anterior, posterior e inferior, y tres bordes: superior, anterior e inferior. El tubérculo pancreático posterior es una prolongación del borde superior que contacta con la cara posterior del epiplón menor.

Las principales formaciones situadas por delante del páncreas son el estómago y a veces el colon transversal. Las relaciones

nes posteriores son: 1.- La vena cava inferior, la aorta, los vasos renales y genitales y la parte del riñón derecho situada por detrás de la cabeza; 2.- Las venas mesentéricas superior y porta, por detrás del cuello; 3.- El diafragma, la glándula suprarrenal izquierda, el riñón izquierdo y los vasos renales por detrás del cuerpo, y 4.- La vena esplenica se situa habitualmente por detrás del cuerpo y la cola del páncreas; la cola es más movable que el resto del páncreas y, por tanto, de relaciones variables. (Fig.2.1)

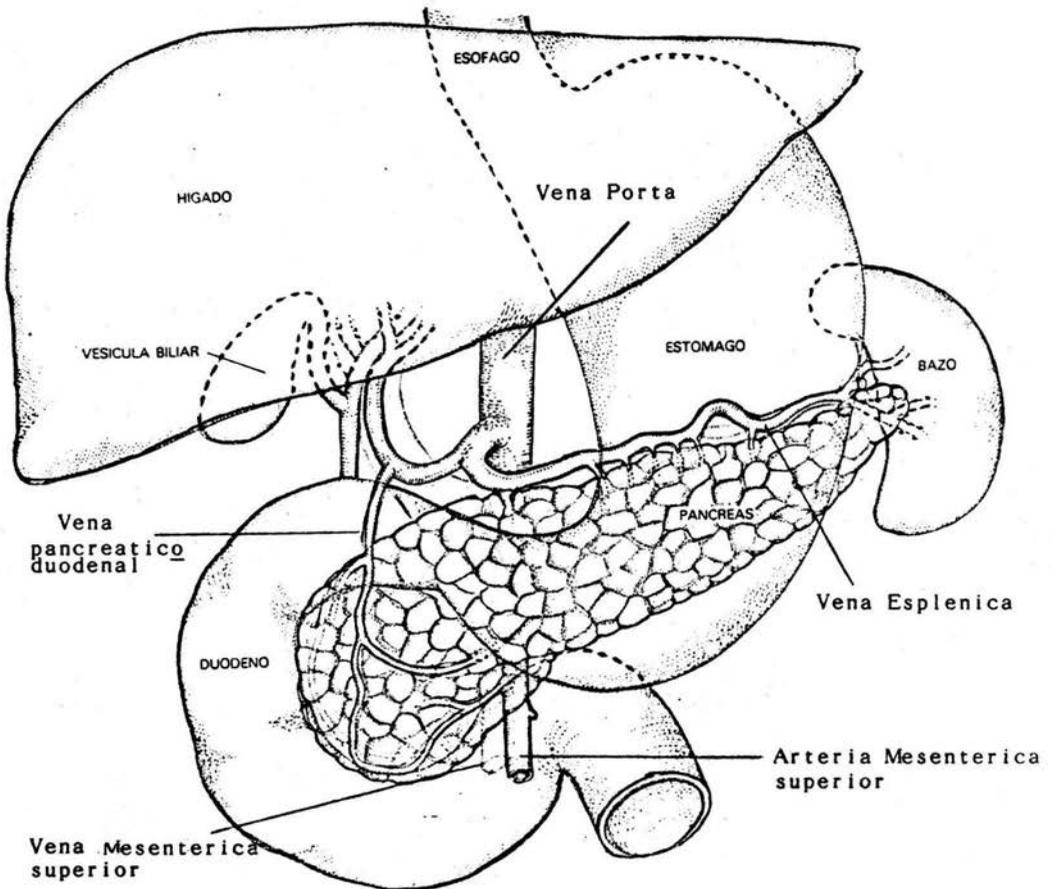


FIG. 2.1 LOCALIZACION Y RELACIONES DEL PANCREAS
(Tomado de: Notkins, A. L. 1980.)

El páncreas es un órgano retroperitoneal, pero la cola del mismo esta rodeada de peritoneo las dos hojas del mesocolon-transverso se proyectan hacia adelante desde el páncreas. La hoja superior se continua con la posterior del epiplón mayor, a la que se adhiere ó fusiona. La hoja inferior del mesocolon transverso cubre la cara inferior del cuerpo del páncreas y la anterior de la cabeza, desde la que pasa por delante de la tercera y cuarta porciones del duodeno y se continua con la hoja derecha del mesenterio.

El conducto pancreático que constituye la derivación principal de la secreción pancreática, se origina en la cola del páncreas y se dirige hacia la derecha, en la proximidad de la cara posterior de la glándula. Próximo al cuello se dirige hacia abajo y a la derecha y entra en relación con el coledoco, junto con el cual desemboca en la segunda porción del duodeno, en la papila duodenal mayor. Frecuentemente existe un conducto pancreático accesorio que drena una parte de la cabeza, se dirige hacia arriba, por delante del conducto pancreático, con el que generalmente se une, y desemboca en el duodeno en la papila duodenal menor.

Como se mencionó anteriormente el páncreas es a la vez una glándula exocrina y endocrina. Su porción exocrina se compone de unidades secretoras, los acinos pancreáticos. Cada uno de ellos esta formado por cierto número de células glandulares dispuestas en forma que sus secreciones se vierten en un sistema de conductos que desaguan en el duodeno.

La porción endocrina de la glándula se compone de pequeños grupos de células, los islotes de Langerhans diseminados en el espesor del órgano. Cada islote se halla ricamente irrigado por capilares, en los cuales las células descargan diversas hormonas; entre ellas la insulina.

El jugo pancreático contiene una serie de enzimas que actuan en el duodeno, en la digestión de las proteínas, grasas y carbohidratos. (Fig. 2.2) (35).

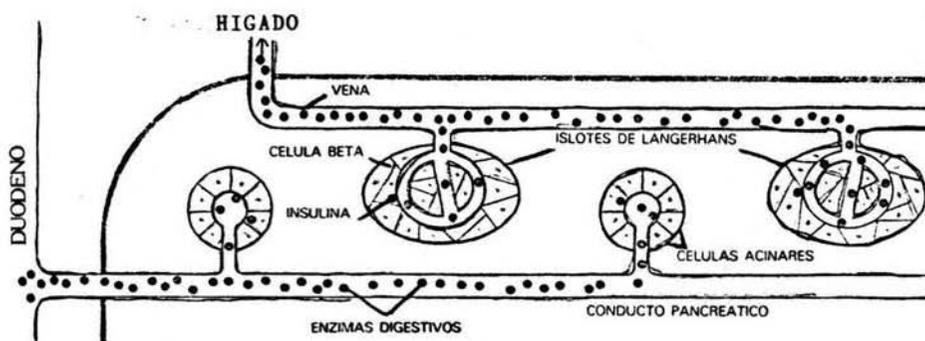


Fig. 2.2 CELULAS FUNCIONALMENTE DISTINTAS QUE COMPONEN AL PANCREAS:
 LAS CELULAS ACINARES Y LOS ISLOTES DE LANGERHANS.
 (tomado de: Notkins, A. L. 1980.)

HISTOLOGIA DEL PANCREAS

En particular, la porción exocrina se presenta como una glándula acinosa compuesta, la cual carece de conductos estriados. Otra de las características del páncreas es que el conducto intercalar penetra en la luz de los acinos donde se presenta como células claras, redondeadas, llamadas células centroacinosas. (FIG 2.3)



FIG. 2.3 ACINO DE PANCREAS EXOCRINO
 (tomado de: Junqueira, J. C. 1981.)

Los conductos intercalares confluyen a los conductos interlobulillares revestidos por epitelio prismático.

Las células acinosas pancreáticas son muy ricas en RNA, lo que explica la intensa basofilia de la porción basal del citoplasma. Es una de las células más ricas en ácido ribonucleico de nuestro organismo, lo que está en armonía con su intensa actividad de síntesis proteica.

El páncreas presenta una cápsula del tejido conjuntivo extremadamente fina y poco visible que envía septos a su interior, dividiendo a la glándula en lobulillos. Las células de los acinos reposan sobre una membrana basal y están envueltas a su vez, por fibras reticulares y una nutrida red de capilares sanguíneos.

El páncreas exocrino humano produce, además de iones y agua, las siguientes enzimas digestivas: tripsinógeno, quimotripsinógeno, carboxipeptidasa, ribonucleasa, lipasa y amilasa.

El control de la secreción pancreática se efectúa principalmente por las hormonas secretina y pancreocimina, probablemente producidas en el epitelio de las extremidades de las vellosidades del intestino delgado. La primera hormona promueve la abundante secreción de un líquido pobre en proteínas y en actividad enzimática y rico en bicarbonatos. Esta hormona actúa principalmente sobre los procesos de transporte de iones y agua. La secreción provocada por la acción de la colecistocinina es menos abundante, aunque es rica en enzimas y proteínas. Esta hormona actúa principalmente en el proceso de expulsión de los granulos de zimógeno.

La porción endocrina del páncreas la constituyen los islotos de Langerhans y se presentan bajo la forma de aglomerados redondeados de células, contenidas en el tejido pancreático exocrino.

Cada islote está constituido por una serie de cordones formados por células poligonales o redondeadas, entre las cuales hay una rica red de capilares sanguíneos de tipo sinusoidal. Envolviendo al islote y separándolo del tejido pancreático restante, hay una fina cápsula de fibras reticulares. El número de islotes en el páncreas humano es variable, oscilando alrededor de 1,000,000, se admite que los islotes representan aproximadamente

del 1.5 % al 2.0 % del volumen del páncreas. (45)

Las células de los islotes se colorean menos intensamente por la hematoxilina-eosina que las células acinosas, lo que explica su aspecto claro cuando son vistas al microscopio óptico.

En los islotes, se distinguen tres tipos celulares denominados: células A ó Alfa, células B ó Beta y células D. Las células Beta son las más numerosas, constituyendo en la especie humana del 60 al 80 % de las células de los islotes, son pequeñas y contienen en su citoplasma gránulos que se colorean en azul con la técnica de hematoxilina-cromica y floxina de Gomori. (FIG 2.4)

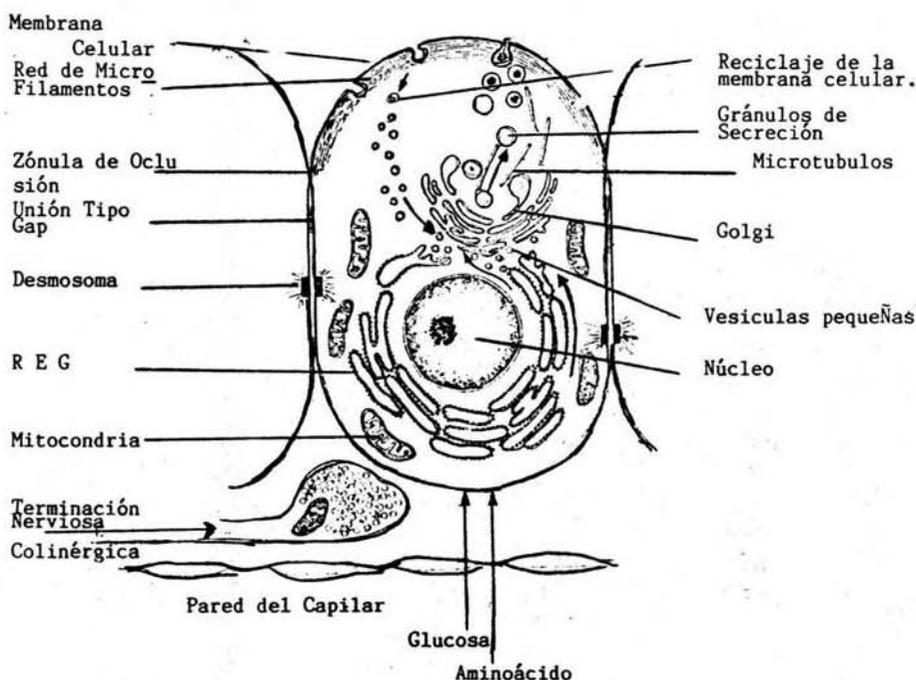


FIG. 2.4 CITOFISIOLOGIA DE LA CELULA BETA DEL ISLOTE PANCREATICO. (tomado de: Junqueira, J.C. 1981.)

Las células alfa están en menor número (20 - 30 %) que las beta, tienen mayor tamaño, y contienen gránulos más gruesos que se colorean de rojo mediante la técnica de Gomori. Las células D son pequeñas y se tiñen débilmente, son las menos numerosas del islote (2 - 8 %). La ultraestructura de las células alfa y beta es la de una célula que sintetiza proteínas, conteniendo retículo endoplásmico granular, aparato de Golgi y gránulos de secreción. La cantidad de retículo endoplásmico granular es, sin embargo, en estas células, bastante menor que la de las células acinosas, lo que es de acuerdo con el hecho de que la síntesis proteica es menos intensa en las células del islote que en las acinosas. En efecto, los islotes pesan aproximadamente un gramo y producen alrededor de 2 mg. de insulina por día. Esto representa más o menos 1/50 de la proteína producida por las células acinosas.

Los gránulos de secreción son bien visibles, y gracias a la microscopía electrónica es posible identificar cada uno de estos tres tipos de células sobre la base de las características ultraestructurales de dichos gránulos. (3).

La morfología de los gránulos de las células beta varía mucho con la especie estudiada. En el hombre es extremadamente variada, encontrándose gránulos de diversas formas dentro de la misma célula. Las células beta producen y acumulan insulina, que es una hormona hipoglucemiante. Así, se sabe que la inyección intravenosa de aloxana provoca lesión y muerte de las células beta disminuyendo la cantidad de insulina en el páncreas y produce en el animal diabetes crónica. Las células beta muestran morfología variable de acuerdo con la situación funcional del islote. De un modo general, la cantidad de gránulos presentes en estas células es proporcional a la tasa de insulina en el páncreas. Se calcula que los islotes contengan aproximadamente 10 mg. de insulina, es decir, cinco veces la necesidad diaria.

Los gránulos de secreción de las células alfa, en contraste con los de las células beta, se presentan esféricos y regulares. (Fig. 2.5). Las células alfa sintetizan y acumulan una hormona hiperglucemiante, el glucagón. Se desconoce la función de las células D en el islote, pero pruebas de inmunofluorescencia se --

comprobó que las células D producen la hormona somatostatina (o sea, el factor inhibidor de la liberación de la hormona del crecimiento), se ha visto que también esta hormona inhibe la secreción de glucagón y de insulina. (3), (45).

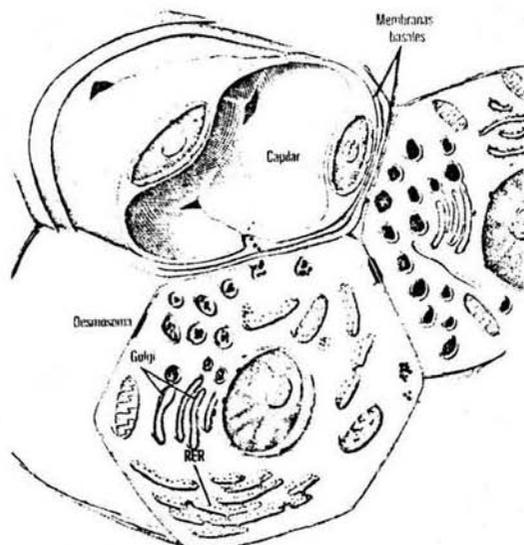


FIG. 2.5 DIBUJO ESQUEMATICO QUE ILUSTRAS LAS CELULAS ALFA Y BETA DEL ISLOTE. LA MORFOLOGIA DE LOS GRANULOS DE SECRECION Y RELACIONES CON UN CAPILAR SANGUINEO. LA CELULA DE LA IZQUIERDA ES UNA CELULA BETA, Y TIENE SUS GRANULOS DE SECRECION IRREGULARES, LA CELULA ALFA (DERECHA) PRESENTA GRANULOS REDONDOS Y REGULARES. (tomado de: Junqueira, J. C. 1981.)

3. Insulina

La insulina ocupa el punto central de todas las observaciones o comentarios sobre la diabetes mellitus. En 1889 Von Mehring y Minkowski, provocaron la primera diabetes experimental mediante la pancreotomía de un perro. Poco tiempo después pudo descubrirse que la sustancia hipoglucemiante era producida por los islotes de Langerhans. Este hallazgo condujo a Banting y Best, en el año de 1921, al aislamiento de la hormona insulina. En 1955 Sanger (62) delucido la estructura química de la insulina bovina, y en 1963, grupos de investigadores Norteamericanos, Chinos y Alemanes, simultanea e independientemente, pudieron lograr la síntesis química de la molécula de insulina. (32), (42)

3.1 Química de la Insulina.

La molécula de insulina esta constituida por dos cadenas polipeptídicas las cuales son conocidas como: cadena A (por ácida) conformada por 21 aminoácidos y cadena B (por básica) formada por 30 aminoácidos, estando unidas entre si por dos puentes disulfuro, además, existe otro enlace de estos entre los residuos 6^o y 11^o de la cadena A.

La molécula completa contiene 51 aminoácidos y fué la primera proteína a la cual se describió con exactitud la secuencia de aa. de ambas cadenas. (Fig. 3.1)

La insulina es una proteína pequeña con un peso molecular que oscila entre los 5,800 daltons (13), y los 6,000 (62). (Este rango suele tomarse como unidad de referencia, de modo que las moléculas de peso molecular menor se denominan péptidos y las de peso molecular superior se denominan proteínas. (18)). El punto isoeléctrico de la insulina es de 5.35. (64)

Por definición, 1 mg. de la sustancia pura contiene 24 unidades internacionales (13).

Se ha observado que la composición de aa. es constante entre las diversas especies, excepto por los residuos 4, 8, 9, y 10 de la cadena A y, 1, 2, 3, 27, 29 y 30 de la cadena B. Las in-

insulinas más utilizadas en clínica son las de origen porcino y bovino. La de cerdo se diferencia de la de humano solo por poseer una alanina terminal en lugar de una treonina en la cadena B, la de origen bovino tiene otras dos diferencias: en las posiciones 8 -- (alanina) y 10 (valina) de la cadena A. (La de cerdo, ballena y perro son estructuralmente idénticas, las de carnero, caballo y vaca difieren de la de cerdo en 3 aa. bajo el puente disulfuro en la cadena A.)

Otras especies pueden diferir hasta en 29 aa del total de 51. Se han aislado dos insulinas estructuralmente diferentes de un solo páncreas de rata, difiriendo en un aa (lisina o metionina) en la cadena A, no obstante, la amplia variación en la estructura primaria y la actividad biológica por unidad de peso es notablemente constante para todas las insulinas (40).

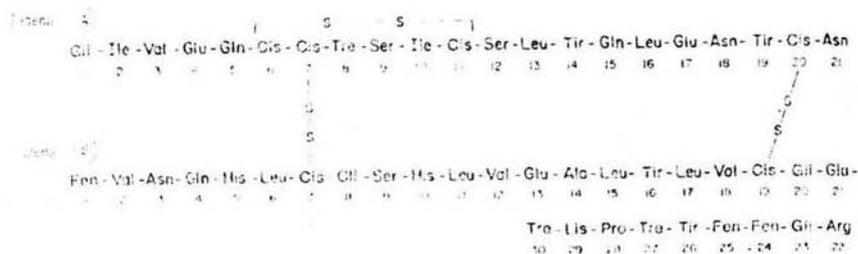


FIG. 3.1 ESTRUCTURA DE LA INSULINA HUMANA.
(tomado de: Felig, P. 1981.)

Hodgkin y Marcola (25), han determinado la estructura tridimensional de la insulina por análisis con rayos X de cristales aislados. La insulina puede existir como monómero, dímero ó hexámero, compuesta por tres de estos dímeros. Dos moléculas de Zn^{2+} se coordinan en el hexámero que es presumiblemente la forma almacenada en los gránulos de las células beta. Se cree que la forma biológicamente activa de la hormona es el monómero. El análisis por rayos X también ha demostrado que las dos cadenas tienen una distribución compacta, con la cadena A por encima de la porción helicoidal central de la cadena B. Desde cada extremo de esta región helicoidal las porciones terminales de la cadena B se extiende como brazos, y la cadena A se queda encerrada entre ellas. (Fig. 3.2).

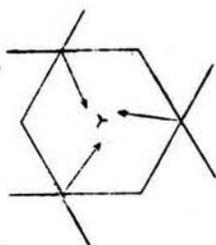


FIG. 3.2 HEXAMERO DE LA INSULINA, EL CRISTAL FORMADO CONTIENE Zn. (tomado de: Goberna, R. 1978.)

Cuando las cadenas A y B son separadas por oxidación ó por reducción de los puentes disulfuro se pierde por completo la actividad biológica. En contraste, esta no se ve afectada en forma apreciable si se quita el grupo amido de la asparagina del extremo carboxílico de la cadena A ó la alanina del extremo equivalente de la cadena B, en cambio, si se pierde por completo la asparagina y la alanina, desaparece aproximadamente el 95 % de la actividad. La misma se anula al ser sometida a una digestión con tripsina ya que se desprende la cadena de 8 aa (residuos 3 - 30) del extremo carboxilo de la cadena B (desoctapeptido de insu-

lina). La región comprendida entre los residuos 22 y 26 de la cadena B se considera de importancia crucial para que la insulina se una a su receptor y para su acción global. (13).

3.2 Biosíntesis de la Insulina.

En 1970, Steiner y colaboradores de la Universidad de Chicago aislaron un precursor de cadena única de la insulina, al que denominaron proinsulina. (68).

La proinsulina tiene un peso molecular de aproximadamente 9,000 (8). Estudios recientes efectuados con sistemas acelulares indican que el primer producto de la traducción del RNA mensajero de proinsulina es un péptido mayor, de peso molecular de 11,500, que contiene 23 residuos adicionales de aa. en el extremo amino. A este precursor se le ha llamado preproinsulina, y se cree que se descompone rápidamente (a los pocos minutos de formado) en proinsulina por efecto de las proteasas microsómicas. (39).

La proinsulina esta formada por una molécula en espiral en que las cadenas A y B estan enlazadas por un péptido de conexión (péptido C) integrado por 26 a 31 residuos de aminoácidos. La molécula empieza con la secuencia de la cadena B normal en su amino terminal, el péptido C conecta al carboxilo terminal de la cadena B con el amino terminal de la secuencia de aa de la cadena A. (Fig. 3.3)

En contraste con las diferencias menores en la secuencia de aminoácidos de las cadenas A y B de las distintas especies, es considerablemente mayor la variabilidad de la estructura de los péptidos C correspondientes. Así mientras que las insulinas humanas y porcinas difieren nada más en un aminoácido, el péptido C humano, cadena de 23 aminoácidos con un peso molecular de 3,021, difiere del péptido C porcino en 10 residuos, y contiene dos aminoácidos menos (Fig. 3.4). Este elevado índice de mutación va de acuerdo con la carencia de función hormonal específica del compuesto. Aunque la proinsulina manifiesta un pequeño grado de reactividad cruzada con los anticuerpos antiinsulinicos, posee tan solo del 3 al 5 % de eficacia biológica de la insulina nativa. No

se sabe aún si esta escasa actividad es efecto directo de la proinsulina o consecuencia de su transformación en la hormona final por los tejidos blanco.

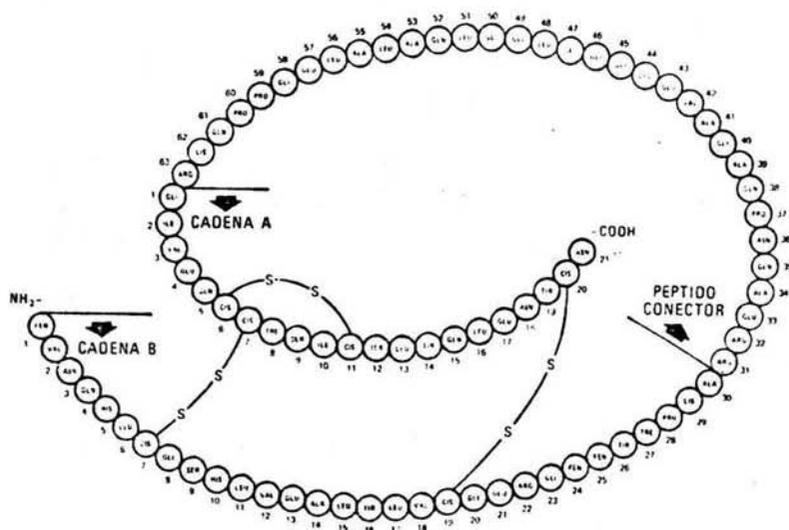


FIG. 3.3 ESTRUCTURA DE LA PROINSULINA PORCINA.
(tomado de: Martin, W.D. 1984.)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Humana | Glu | Ala | Glu | Asp | Leu | Glu | Val | Gli | Gln | Val | Glu | Leu | Gli | Gli | Gli | Pro |
| Porcina | Glu | Ala | Glu | Asn | Pro | Gln | Ala | Gli | Ala | Val | Glu | Leu | Gli | Gli | Gli | Leu |
| Bovina | Glu | Val | Glu | Gli | Pro | Gln | Val | Gli | Ala | Leu | Glu | Leu | Ala | Gli | Gli | Pro |
| | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | |
| Humana | Gli | Ala | Gli | Ser | Leu | Gln | Pro | Leu | Ala | Leu | Glu | Gli | Ser | Leu | Gln | |
| Porcina | Gli | --- | Gli | --- | Leu | Gln | Ala | Leu | Ala | Leu | Glu | Gli | Pro | Pro | Gln | |
| Bovina | Gli | Ala | Gli | --- | --- | --- | --- | --- | Gli | Leu | Glu | Gli | Pro | Pro | Gln | |

FIG. 3.4 COMPARACIONES DE LOS PEPTIDOS C.
HUMANO, PORCINO Y BOVINO
(tomado de: Katzung, G. B. 1984.)

Dentro de la célula la preproinsulina se sintetiza y se descompone rápidamente en proinsulina en el polisoma del retículo endoplásmico rugoso. De ahí, la proinsulina es transportada por un fenómeno activo al aparato de Golgi, en donde se incorpora en microvesículas de superficie lisa para formar gránulos secretorios ó de almacenamiento. Desde que llega al complejo de Golgi y ya incorporada a los gránulos, las proteasas de la membrana la descomponen en cantidades equimolares de insulina y péptido C. Durante la proteólisis biológica los dos aa. básicos en cada extremo del péptido conector (péptido C) son eliminados (arginina 31, 32 y lisina 62, arginina 63). El péptido C y el Zn, se acumulan en el núcleo central del gránulo secretorio en formación, que progresivamente se hace más electrodensó; El péptido C se situa en el espacio periférico claro. (Fig. 3.5).

Para que los gránulos secretorios maduros liberen su contenido, es preciso que emigren progresivamente hasta la membrana celular, donde expulsan la insulina y el péptido C. (18). Dentro del citosol de las células beta, los microtubulos (estructuras de 24 nm de diametro formadas por subunidades dímeras cuyo peso molecular es de 120,000, llamadas tubulinas) sirven para guiar el desplazamiento del gránulo hasta la membrana plasmática. Ahí, una serie de microfilamentos (estructuras de 4 a 8 nm que se cree que estan compuestas por la proteína contractil actina) forman una red cerca de dicha membrana y rodean a los gránulos. Se cree que la vía final común de la secreción de las células beta incluye la entrada de calcio en la célula, lo cual produce contracción de los microfilamentos. En consecuencia, los gránulos salen a la superficie celular, donde su membrana se fusiona con la plasmática y su contenido es expulsado hacia el espacio extracelular. Este fenomeno de fusión de membrana se ha llamado emiocitosis o exocitosis. La proinsulina almacenada en el páncreas o que se encuentra en el plasma, puede ser medido por técnicas específicas de radioinmuno análisis ó, después de separarla de la insulina mediante cromatografía por tamizado molecular. La insulina plasmática esta moderadamente elevada en los individuos diabéticos, pero puede ser la forma predominante en circulación en algunos sujetos con tumores de células insulares (31).

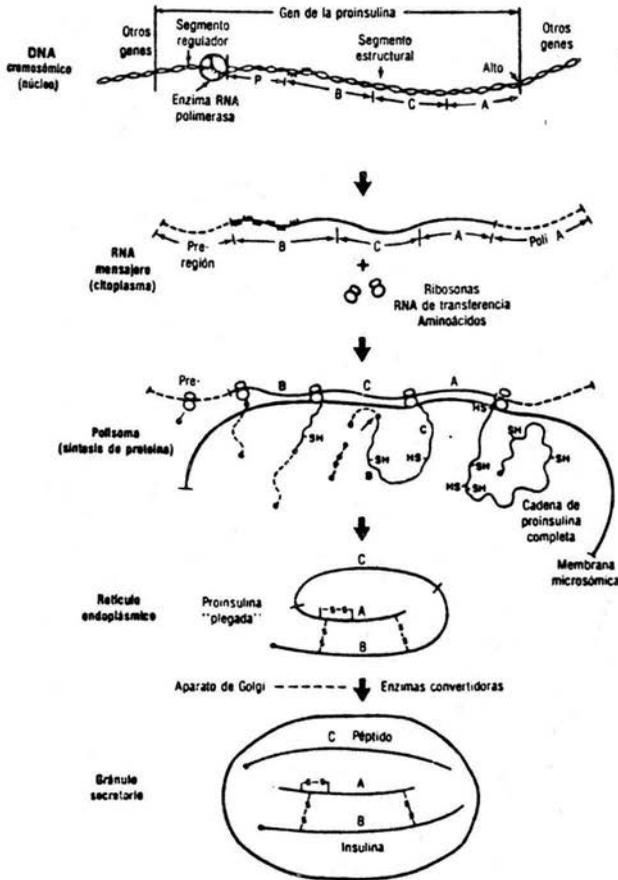


FIG. 3.5 RESUMEN ESQUEMATICO DE LA BIOSINTESIS DE PROINSULINA, Y SU CONVERSION A INSULINA Y PEPTIDO C. (tomado de: Felig, P. 1981.)

El gen para la insulina ha sido localizado en el brazo corto del cromosoma II. Se ha determinado su estructura en varias especies. El gen contiene toda la información para la preproinsulina, más las frecuencias adicionales de ambos extremos, 5' y 3'. Parte de la estructura que precede y que sigue a la preproinsulina incluye probablemente las secciones de iniciación, polimerasas y reguladoras. Se han encontrado dos intrones ó secuencias intermedias, uno previo al extremo 5' del gen estructural y otro insertado en la porción que conecta ó péptido C. (Fig 3.5). (13). (72)

La reciente creación de métodos químicos para sintetizar DNA, asociada con la tecnología de recombinación de DNA, ha permitido que células bacterianas (*Escherichia coli*) sintetizen in vivo proinsulina de rata o las cadenas A y B de la insulina humana. (fig. 3.6).

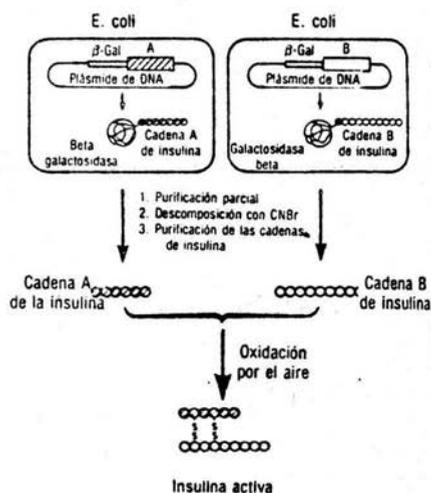


FIG. 3.6 RESUMEN ESQUEMATICO DE LA SINTESIS DE LAS CADENAS A Y B DE LA INSULINA POR BACTERIAS (*E. coli*). (tomado de: Felig, P. 1981.)

El plan de síntesis implica ya sea la transcripción inversa del RNA mensajero que codifica la proinsulina, para así -- obtener el DNac (DNA de copia) de esta; ó bien la síntesis química de los fragmentos de DNA más pequeños que codifican las cadenas A y B de la insulina humana. A continuación, los genes sintéticos se fusionan con un gen que normalmente se expresa en la E. coli huesped (por ejemplo penicilinas, Beta-galactosidasa) para que la transcripción y traducción sean eficientes, a fin de obtener una proteína precursora estable y (en el caso de una proteína periplásmica como la penicilinasasa) para facilitar su salida de la célula. Los vectores usados para introducir el DNA extraño y propio en la bacteria son bacteriofagos o plásmides. La célula que contiene la plásmide transcribirá su propio gen y el que se le introdujo, con lo cual producirá el polipéptido deseado. (19).

El hecho de que actualmente las secuencias de DNA eucariótico puedan clonarse y expresarse en células procariotas (bacterias) puede tener su aplicación más inmediata en el uso de la síntesis bacteriana para producir insulina humana, la cual se emplea para tratar a los enfermos diabéticos dependientes de esta hormona. De este modo, la insulina es la primera hormona de peso molecular elevado que se fabrica mediante el proceso auténtico de la maquinaria genética. A partir de 1982 ya existe en el comercio y por tanto, esta tecnología puede proporcionar cantidades ilimitadas de insulina y acabar por substituir a los procedimientos de producción que entrañan su extracción del páncreas porcino ó bovino. (21), (19).

3.3 Secreción de Insulina.

Los gránulos de las células beta están rodeados de una membrana, en dicha membrana no ha sido posible detectar la presencia de ribosomas. Ante un adecuado estímulo secretorio, los gránulos y su tenue membrana envolvente se desplazan a la periferia de la célula, en la que las membranas granular y citoplasmática se fusionan. Posteriormente, la membrana se invagina y los gránulos son expulsados al espacio extracelular, a este tipo de secreción se le denomina emiocitosis. En general, existen diver-

Los estímulos, tales como la glucosa, leucina o sulfonilureas que provocan la secreción de insulina por este mecanismo. (42) (18). En la figura 3.7 se indican algunas de las múltiples sustancias capaces de estimular aisladamente la secreción de insulina.

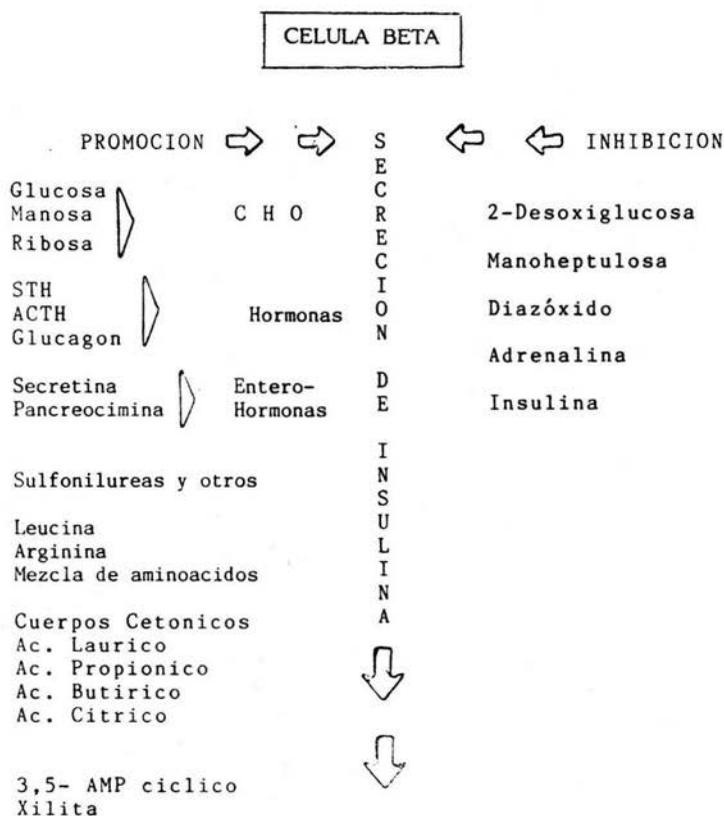


FIG. 3.7 INFLUENCIA DE DIVERSAS SUSTANCIAS SOBRE LA SECRECION DE INSULINA.
(tomado de: Mehnert, F. 1977.)

Tiene gran importancia práctica el hecho de que tanto - las comidas proteícas como las mezclas de aminoácidos provoquen - la secreción de insulina. Así mismo, es muy significativo el hecho de que las hormonas gastrointestinales, cuya liberación es - activada en el proceso de la digestión, originen por si mismas, una acción potenciadora de la secreción de insulina. Este hallazgo debe ser la base de la observación, difícilmente explicable, de - que la administración oral de la glucosa provoca una mayor elevación de los niveles de insulina en el suero que la inyección intravenosa del azúcar, no obstante, la menor hiperglucemia provocada en el primer caso. (42).

También son interesantes las sustancias que inhiben la secreción de insulina (Fig. 3.7). Junto a las sustancias de uso - fundamental en trabajos experimentales (por ejemplo la nanoheptulosa), han adquirido significación extraordinaria ciertos farmacos como el derivado tiacídico denominado diazoxido. La acción - inhibidora de la secreción insulínica del diazoxido es tal, que permite su uso en el tratamiento de los insulinomas. Sin embargo, el inhibidor de la secreción de insulina con máxima significación fisiológica es verosimilmente la propia insulina. Si así fuera, - el nivel sanguíneo de insulina actuaría en este ciclo biológico - como detector y regulador.

En particular, y desde el punto de vista fisiológico la glucosa es el factor más importante para estimular la secreción - de insulina. Esto se refleja en las fluctuaciones plasmáticas - constantes de la hormona que acompañan las variaciones del azúcar. Sin embargo, no se ha aclarado del todo el mecanismo exacto por el cual este glúcido actúa sobre las células beta para que liberen su secreción. Se han propuesto dos hipótesis alternativas: una se refiere al metabolismo de la glucosa dentro de las células insulares y la otra a la interacción de la molécula de azúcar con un receptor de membrana (glucoreceptor). La hipótesis metabólica se ve favorecida por las siguientes observaciones: 1.- los azúcares susceptibles de metabolizarse (hexosas ó triosas), son estímulos más poderosos de la secreción de insulina que los carbohidratos no metabolizables (por ejemplo la manosa). 2.- la glucosa au-

menta la concentración de intermediarios glucolíticos dentro de las células insulares y 3.- los compuestos que inhiben el metabolismo de este azúcar (nаноheptulosa y 2-desoxiglucosa) perturban la secreción de la hormona.

En contraste, se ha pensado que muchas observaciones apuntan hacia la existencia de un mecanismo por el cual la glucosa es reconocida por un receptor de la membrana (glucoreceptor) lo cual desencadena la liberación de insulina. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que mediante bloqueadores enzimáticos (Yodoacetato la liberación de insulina puede disociarse del flujo metabólico de glucosa por la vía glucolítica, y que el anómero alfa del azúcar constituye un estímulo más eficaz para la secreción de la hormona que el anómero beta, a pesar de que aparentemente ambos son metabolizados por igual en las células insulares. Descubrimientos más recientes indican que el anómero alfa es un sustrato más adecuado que el beta para la glucólisis por las células insulares y que el paso estereoespecífico se encuentra a nivel de la isomerasa de fosfo glucosa. Los mecanismos por los cuales la glucólisis promueve la secreción de insulina pueden funcionar mediante un aumento en el NADH y el NADPH celulares, así como la concentración de H^+ . (46).

El AMPc también participa en la secreción de insulina, se cree que su aumento sirve como modulador positivo de un paso secretorio sensible a glucosa. Pero por si mismo no basta para estimular dicha secreción, como el hecho de que la teofilina (inhibidora de la fosfodiesterasa) eleva el AMPc pero tiene escaso efecto estimulador sobre la secreción de la hormona, a menos que haya glucosa.

Se cree que un aumento en el calcio intracelular es el mecanismo desencadenante final por el cual la glucosa u otros estímulos producen liberación de insulina por las células beta. Estas alteraciones del catión se deben a inhibición de su salida por la glucosa y a que el AMPc incrementa la movilización del almacenado dentro de la célula. La importancia de las modificaciones del calcio intracelular reciben gran apoyo de las investigaciones en que se emplean ionóforos, (moléculas que actúan como acarreado

res de membrana para el transporte de iones). En presencia del ácido monocarboxílico heterocíclico 23187 ionoforo catiónico divalente y específico que transporta calcio a través de las membranas biológicas, la adición del catión a las células beta produce un incremento repentino e intenso, se secreción de insulina sin que aumente la glucosa, o un aumento del AMPc, intracelular.

Lo anterior se puede resumir de la siguiente manera: la entrada de glucosa en la célula beta causa glucólisis que aumenta los nucleótidos de piridina reducidos (NADH y NADPH) y la concentración de AMPc, estos cambios producen acumulación neta de calcio, lo cual desencadena la liberación de insulina. (Fig. 3.8).

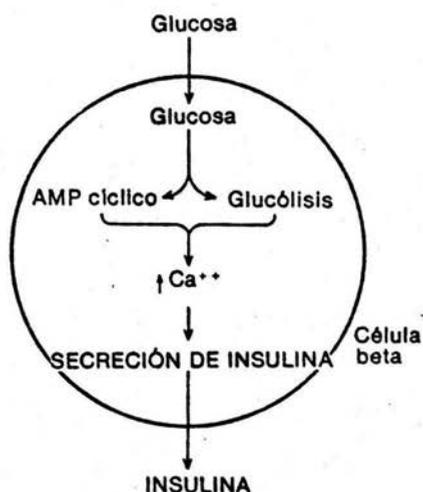


FIG. 3.8. FENOMENOS INTRACELULARES DEL EFECTO DE ESTIMULACION DE LA SECRECION DE INSULINA POR LA CELULA BETA. (tomado de: Felig, P. 1981.)

Un rasgo característico de la respuesta de insulina provocada por la glucosa es su naturaleza bifásica. Como se puede observar en la figura 3.9, al minuto de aparecer un estímulo glucé-

mico, empieza un rápido ascenso inicial de la secreción, que alcanza su máximo a los dos minutos y desciende en los siguientes 3 a 5. Una segunda fase, caracterizada por un aumento más gradual de la concentración de la hormona, comienza aproximadamente de 5 a 10 minutos después de iniciada la inyección endovenosa lenta -- del glucido y continua durante la hora siguiente. En el páncreas perfundido la puomicina, inhibidora de la síntesis proteíca, atenúa la segunda fase pero carece de efecto sobre la primera. Estas observaciones han llegado a proponer que dentro de la célula beta la insulina se encuentra en un sistema de dos fondos comunes. Uno, el fondo de liberación inmediata, que esta formado por la hormona sintetizada anteriormente y se vacia en forma rápida durante la fase secretoria temprana. El segundo fondo ó de liberación crónica, esta compuesto por la insulina que se va sintetizando y pequeñas cantidades de proinsulina, además de la hormona almacenada que se formó antes, y se vacia gradualmente durante la segunda fase. El mecanismo por el cual la glucosa estimula la síntesis de insulina es posttranscripcional, y ocurre independientemente de la síntesis de RNA mensajero nuevo. (46)

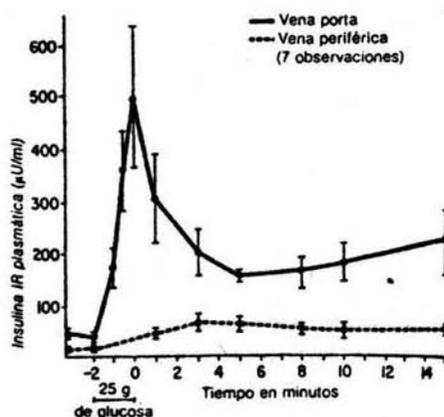


FIG. 3.9. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE INSULINA EN SANGRE VENOSA PORTAL Y PERIFERICA, ANTES Y DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE GLUCOSA. (tomado de: Felig, P. 1981.)

Ya desde 1906, Moore y col. señalaron que el duodeno - proporciona un estímulo químico para la secreción interna del páncreas. Posteriormente, LaBarre demostró una reacción hipoglucémica a los preparados sin purificar de secretina, y en 1926, postuló la existencia de una "incretina", factor producido por el tubo digestivo, que estimula la secreción interna pancreática.

El tubo digestivo puede influir en la secreción de insulina por conducto de tres mecanismos: 1.- absorción de nutrientes y entrada de estos a la circulación general, 2.- liberación de hormonas digestivas, y 3.- señales neurogénicas provocadas por la ingestión de alimento, (Entre los péptidos candidatos con funciones demostradas de enterohormonas se encuentran la secretina y pancreocinina). (Fig. 3.10)

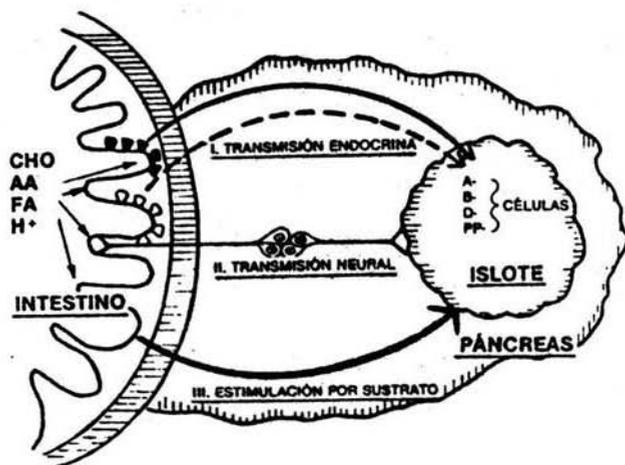


FIG. 3.10 LA ENTRADA DE NUTRIENTES AL INTESTINO INFLUYE EN LA SECRECIÓN DE HORMONAS INSULARES. 1.- TRANSMISIÓN ENDOCRINA (LIBERACIÓN DE POLIPEPTIDO INHIBIDOR GÁSTRICO), 2.- NEUROTRANSMISIÓN (ESTIMULACIÓN VAGAL) Y 3.- ESTIMULACIÓN POR SUSTRATO (ABSORCIÓN DE GLUCOSA QUE OCASIONA HIPERGLUCEMIA). (tomado de: Felig, P. 1981.)

La ingestión de proteínas o la inyección endovenosa lenta de uno o varios aminoácidos estimulan la secreción de insulina. Como sucede con la glucosa, el estímulo es mayor por vía bucal que por vía intravenosa, lo cual indica un incremento por hormonas digestivas. Dicho efecto puede estar mediado por la secreción de gastrina estimulada por la protefna. En relación con los aminoácidos se ha demostrado que análogos no metabolizables de leucina y arginina estimulan la secreción de insulina, lo cual hace pensar que el factor desencadenante es un reconocimiento de membrana (interacción con el receptor) más bien que el metabolismo intracelular. (17).(37)

3.4 Mecanismo de Acción de la Insulina

La insulina, es una hormona que estimula reacciones anabólicas que transforman los monosacáridos en polisacáridos, los aminoácidos en proteínas y los ácidos grasos en triglicéridos, es decir, contribuye a la síntesis de macromoléculas que tienen capacidad funcional, estructural o de depósito. La acción de la insulina varía con el tipo de tejido, tipo y cantidad de sustratos, y tipo y concentración de otras hormonas. La acción de la insulina depende de su combinación con un receptor altamente específico a nivel de la membrana celular, el cual está constituido por 4 subunidades enlazadas por puentes disulfuro, su estructura consta de dos cadenas alfa y dos cadenas beta. (40). La cantidad de insulina unida a la membrana está en paralelo con la actividad biológica en el tejido, y las actividades biológicas de la insulina modificadas, son proporcionales a sus afinidades de unión; sugiriendo ambas cosas que la fijación es requisito para la actividad hormonal, por lo tanto, la insulina puede ejecutar la mayor parte de sus funciones sin que en realidad penetre a la célula. (71)

Una vez que la insulina se une a su receptor (Fig. 3.11), origina la degradación de las glicoproteínas de la membrana por proteólisis, liberándose un pequeño mediador oligoglucopeptídico (P.M. 1,000 - 1,500).

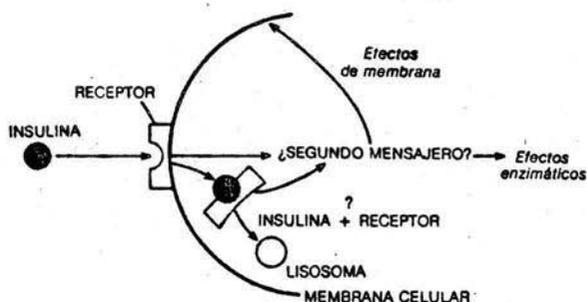


FIG. 3.11 INTERACCION DE LA INSULINA CON SU RECEPTOR.
(tomado de: Felig, P. 1981).

Este mediador, a su vez es liberado hacia el interior de la célula donde activa (posiblemente por vía de fosfatasas específicas), las desfosforilaciones proteicas. Estas desfosforilaciones proteicas pueden explicar muchas de las acciones de la insulina, - incluyendo la activación del sistema de transporte, la síntesis de glucogeno, la glucólisis, etc. La insulina activa además según ha sido descrito, unas cuantas reacciones en las cuales aumenta la fosforilación más que la desfosforilación (por ejemplo: La actividad de Ca-Mg-ATPasa, que interviene en el transporte de calcio), y se sugiere la existencia de un segundo mediador en la acción de la insulina. Aunque la unión de la insulina a su receptor no requiere calcio, la manifestación de la actividad de la insulina, posiblemente a nivel del mediador, depende del calcio. (59)

La invaginación de los receptores para insulina, aunque por lo general se piensa que es la vía para la destrucción de la hormona, por medio de los lisosomas (ver más adelante en degradación de insulina) podría permitir la entrada de la insulina y la actividad sobre los eventos intracelulares particularmente en el núcleo. (37), (Goldfine 1981)

Se puede decir que la insulina tiene un mecanismo doble; a) aumenta la permeabilidad de la membrana y b) transmite señales que originan ciertas reacciones bioquímicas en el interior de la célula. (74).

Entre las reacciones específicas de la insulina (Ver cuadro 3.1), destacan las que dependen de la utilización de glucosa

CUADRO 3.1 ACCIONES ESPECIFICAS DE LA INSULINA
(tomado de: Zarate, A. 1981.)

La insulina estimula los procesos siguientes;

- Transporte a través de la membrana; de monosacáridos, aminoácidos, grasas, potasio, fósforo y magnesio.
- Oxidación de glucosa.
- Glucogenogénesis.
- Proteogénesis
- Lipogénesis
- Síntesis de ATP, DNA, RNA.

La insulina inhibe los procesos siguientes:

- Glucogénesis
- Proteólisis
- Lipólisis
- Gluconeogénesis
- Cetogénesis

en el metabolismo de los CHO, que se inician con el transporte a través de la membrana, seguido de la transformación a glucosa-6-P en presencia de una hexocinasa y de la utilización por alguna de las vías siguientes: 1.- Glucólisis, 2.- Vía Oxidativa del Fosfogluconato, 3.- Vía del Ácido Glucurónico, 4.- Gluconeogénesis y 5.- Reconversión a glucosa por la glucosa-6-fosfatasa. Sin embargo, el 90 % de la glucosa que no es utilizada para producir energía, es almacenada bajo forma de lípidos y la insulina favorece la síntesis de ácidos grasos a partir de moléculas de Acetil-CoA; de triglicéridos a partir de ac. grasos y glicerol, y de colesterol también a partir de Acetil-CoA. Al mismo tiempo, la insulina inhibe la lipólisis por efecto directo y su deficiencia ocasiona una liberación

excesiva de ácidos grasos del tejido adiposo que se acumulan en el hígado y son utilizados para la síntesis de cuerpos cetónicos; acetoacético, ác. beta-hidroxibutírico y acetona. En la síntesis de proteínas, la insulina también desempeña un papel múltiple; estimula el transporte de aminoácidos al interior de la célula, cataliza la incorporación de aminoácidos a las proteínas y estimula la formación de RNA mensajero, Necesario para la transmisión del código proteico del DNA nuclear a los ribosomas citoplasmáticos. Algunos efectos de la insulina ocurren en todas las células, otros son específicos o característicos de algunos tejidos. El tejido adiposo, el muscular y el hígado son los tejidos blanco principales de la insulina. (Fig. 3.12). (42), (37), (52), (74).

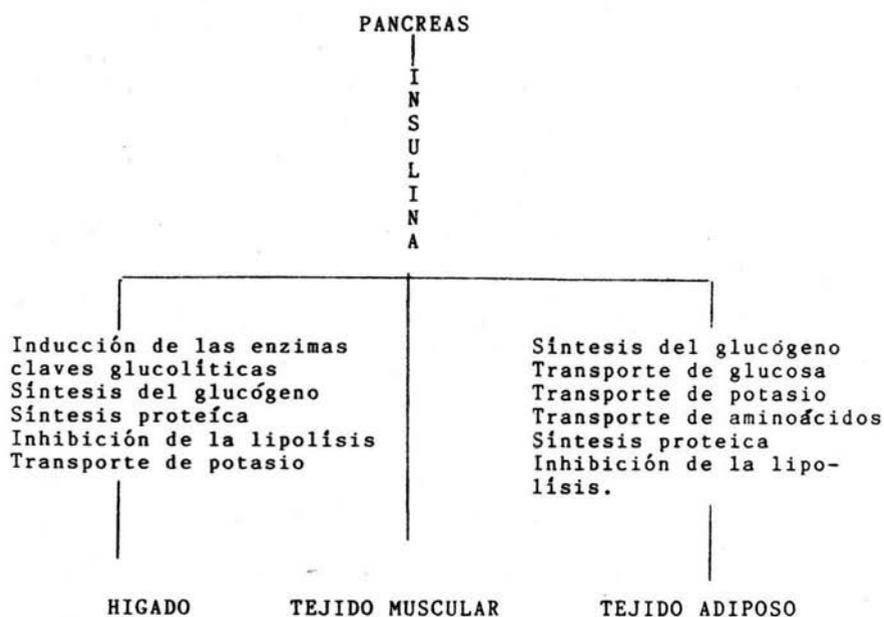


FIG. 3.12 EFECTOS METABOLICOS PRINCIPALES DE LA INSULINA.
(tomado de: Mehnert, F. 1077.)

Músculo y Tejido Adiposo.

Un efecto primario y rápido de la insulina en el músculo y tejido adiposo, es facilitar el transporte de varias sustancias a través de la membrana plasmática. Estos incluyen a la glucosa y mosacáridos emparentados, aminoácidos, ion potasio, nucleótidos, fosfato inorgánico e ion calcio. La insulina incrementará el transporte y facilitará el aumento en la concentración intracelular de azúcares no metabolizables como la L-arabinosa, y Xilosa así como galactosa. La hormona fomenta la entrada a las células - aquellos CHO que poseen la misma configuración en los C-1, C-2, y C-3 que la D-glucosa. La fructosa no requiere insulina para ser transportada al interior de las células, posiblemente debido al grupo cetónico de la posición 2. El transporte intracelular de glucosa es amplificado por la anoxia o por agentes desacoplantes como el di-nitrofenol, lo que indica que la exclusión de glucosa del músculo o del tejido adiposo pueden requerir energía.

En el músculo o tejido adiposo, el consumo de glucosa por la célula es el paso limitante de la velocidad para todo el metabolismo subsiguiente de la glucosa dentro de la célula. Así la capacidad de la insulina para facilitar el transporte conduce a un incremento de todas las vías del metabolismo de la glucosa.

En el tejido adiposo, la insulina eleva la síntesis de lípidos aportando Acetil CoA y NADPH requeridos para dicha síntesis, así como la porción glicerol (glicerofosfato) para la síntesis de triglicéridos. La insulina disminuye la liberación de ácidos grasos, inducida por la acción de la adrenalina o el glucagón. La insulina impide en parte, la lipólisis por medio de la supresión del aumento del AMPc efectuado por la adrenalina o el glucagón. La insulina también puede desfosforilar y por lo tanto inactivar a las lipasas encargadas de la lipólisis. La reducción por la insulina de la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo es muy importante, puesto que los valores de ácidos grasos circulantes son responsables de muchos efectos sobre los eventos metabólicos intracelulares, tanto en el músculo como en el hígado, ya que puede contribuir a la inhibición en varias etapas de la vía y estimulan

do la gluconeogénesis.

La insulina puede hacer aumentar directamente la síntesis de proteínas porque la hormona facilita la incorporación intracelular de aminoácidos (de acuerdo con los hallazgos actuales, y en contraste con lo que sucede en el caso de los azúcares, los aminoácidos son transportados de modo activo. Esto lo demuestra el que, en condiciones experimentales, la concentración intracelular de aminoácidos llega a ser 2 - 3 veces superior a la del medio de incubación. Ciertamente este transporte tiene lugar incluso en medio de incubación libres de glucosa. (3), (23), (24)); puede actuar a nivel de ribosoma al incrementar la capacidad de este organelo para traducir la información del RNAm. La insulina mantiene la proteína muscular por medio de la disminución de la degradación proteica (42),

Hígado.

La insulina es secretada directamente a la vena porta. Así, el hígado está expuesto a concentraciones altas de la insulina en los segundos que siguen a su secreción. Por lo tanto, el hígado es un órgano primario afectado por la insulina, a diferencia del músculo y tejido adiposo no existe una barrera para el transporte de la glucosa en el hígado.

En este órgano las concentraciones extra e intracelular de glucosa son aproximadamente iguales; sin embargo, una acción de la insulina en la membrana de la célula hepática puede ser todavía un proceso primario, pues la unión específica de la insulina a las membranas hepáticas no ha sido demostrada.

La insulina también induce de modo indirecto la síntesis de enzimas específicas que intervienen en la glucólisis y reprime a enzimas específicas de la gluconeogénesis. Se sugiere que la insulina puede actuar sobre un locus genético en el núcleo que coordina la expresión de un grupo de enzimas específicas. Así la insulina estimula la glucólisis efectuando un incremento simultáneo en la síntesis de glucocinasa, fosfofructocinasa y piruvato-cinasa. Al mismo tiempo, la insulina reprime a las enzimas que controlan a la gluconeogénesis: piruvatocarboxilasa, PEPcarboxi-

cinasa, fructosa-1, 6-difosfatasa y a la glucosa-6-fosfatasa. - La insulina por conducto de su mediador produce la conversión de estas enzimas a sus formas difosforiladas (lo opuesto a la acción de las hormonas que generan AMPc como el glucagón y las Catecolaminas). Esta acción es independiente del AMPc y puede ser a nivel de las proteincinasas o proteinfosfatasa. Por lo tanto, la actividad de la piruvatocinasa (que aumenta la glucólisis), piruvato-deshidrogenasa (que aumenta la vfa del ciclo de Krebs) y la de la glucogenosintetasa (que aumenta la gluconeogénesis) se encuentra aumentada en todas, mientras que la actividad de la glucosa-1,6-difosfatasa (aumenta la gluconeogénesis) se encuentra disminuida. (40), (33).

Existen otros tejidos como cerebro, retina, epitelio germinal de testículo, y ovario que no requieren la hormona para metabolizar glucosa. (52), (37).

Transporte de Potasio.

Como se mencionó anteriormente la insulina después de unirse al receptor transmite su señal al interior de la célula a través de un segundo mensajero que estimula a dos sistemas enzimáticos unidos a la membrana; el de la Adenilatociclasa-AMPc y el sistema ATPasa-sodio-potasio activados por magnesio. La estimulación del transporte de potasio intracelular (transporte a contracorriente) es uno de los efectos mejor conocidos de la insulina. A su vez, el potasio es un factor importante en el potencial de membrana y en la regulación enzimática. El magnesio se halla involucrado en la activación de muchas enzimas intracelulares, y la insulina promueve su acumulación intracelular. Se ha propuesto que el receptor de membrana de la insulina se localiza cerca del sistema ATPasa-sodio-potasio dependiente de magnesio. El resultado va a ser la acumulación de magnesio intracelular con activación de las enzimas críticas intracelulares. (30), (33). Esta acción de la insulina (transporte de potasio) reviste especial significación terapéutica. Así, en el coma diabético los tejidos están gravemente empobrecidos de potasio; y en esta situación, la adminis-

tración de insulina determina un mayor aflujo de potasio (y de -- glucosa) en distintos tejidos. Esta aumentada derivación intracelu lar del potasio puede conducir a una situación de hipocaliemia - que debe ser vigilada en el curso de la terapéutica. (23), (24)

3.5 Metabolismo de la Insulina.

Como se mencionó anteriormente, después de la interna ción de las vesículas que contienen el complejo insulina-receptor la hormona puede ser destruida por digestión enzimática en las ve sículas lisosómicas o en el citosol. (40).

La degradación de la insulina ocurre en muchos tejidos, pero los más activos son: hígado, riñón y páncreas. En el hígado y en el riñón degradan alrededor del 80 % de la insulina secreta da. En la degradación de la insulina participan dos reacciones he páticas importantes: la primera es catalizada por la glutatión-- transhidrogenasa, que fragmenta los enlaces disulfuros de la in sulina, liberando las cadenas A y B en forma reducida. La segun da reacción incluye la proteólisis. La insulina puede ser degra dada mediante la glutatión-reductasa. Los péptidos circulantes A y B son fragmentados con rapidez por enzimas proteolíticas, con - la formación de pequeños componentes. La presencia de glutatión - reducido resulta necesaria para que ocurra el efecto catalítico de las enzimas degradantes de la insulina. La proinsulina y el -- péptido C también son degradadas por el hígado, pero en menor gra do. La membrana plasmática de los adipocitos contienen un sistema degradante de la insulina que puede tener significado funcional - en la regulación de los efectos de la hormona sobre las células blanco. (30).

La vida media de la insulina circulante es de aproxima damente de 7 - 15 min., cuando la insulina se une a su anticuerpo, es mucho menos sensible a la degradación enzimática. (40).

4. Diabetes: Definición y Transtornos en el Metabolismo.

4.1 Definición

La diabetes es una enfermedad crónica, caracterizada por el aumento de glucosa en la sangre y la excreción de la glucosa - por la orina; depende de la deficiente formación o de la disminuída eficacia de la insulina secretada por las células Beta de los islotes de Langerhans del páncreas, y esta funcionalmente relacionada con los estados patológicos que se originan en el hígado y - en otras glándulas endocrinas, especialmente la hipófisis, pero - también las suprarrenales y la tiroides. (2). (28) (66)

4.2 Transtornos en el Metabolismo.

A continuación esbozaremos de manera general los cambios metabólicos que se producen en la Diabetes Mellitus.

La diabetes es una enfermedad compleja, que presenta - distintas clases y grados de patología. Es una enfermedad hereditaria; en efecto, la tendencia a la diabetes tiene un gran componente genético. Por otra parte, el ejercicio físico y la calidad de alimentación ejercen un profundo efecto sobre su incidencia.

El síntoma primario de la Diabetes M. aguda es la hiper glucemia que va frecuentemente acompañada de glucosuria y poliuria, que consiste en la excreción de grandes volúmenes de orina. Además, se padece de un gran apetito y sed, se experimenta pérdida de peso, y en casos más graves se produce cetonemia (elevado - nivel sanguíneo de cuerpos cetónicos), cetonuria y acidosis, (28) que se manifiesta por un descenso del pH sanguíneo o por una disminución de la capacidad tamponadora de los tampones de la sangre. En la Diabetes crónica se aprecia un conjunto secundario de síntomas, entre ellos la degeneración de las paredes de los vasos - sanguíneos, especialmente (de los capilares finos y de sus membranas de sosten.) Aunque son varios los órganos que resultan afectados por estos cambios vasculares, los ojos parecen ser los más - susceptibles; de hecho, la Diabetes M. incluso tratada con -

insulina, es una de las causas principales de ceguera.

Observaciones importantes fueron las llevadas a cabo por S. Soskin y R. Levine, quienes demostraron que los tejidos periféricos de los animales diabéticos funcionan de un modo deficiente en la extracción de hexosas de la sangre con niveles normales de glucosa sanguínea. Sin embargo, si se aumenta el azúcar sanguíneo hasta niveles elevados, como los presentes en la diabetes grave (hasta 500 mg por 100 ml) la absorción de glucosa resulta sustancialmente incrementada llegando a presentar un ritmo casi normal. Este importante descubrimiento indicaba que la deficiencia fundamental del metabolismo de la glucosa residía más bien en un transporte defectuoso del azúcar sanguíneo a través de las membranas de los músculos esqueléticos y de otros tejidos, que en la falta de algunos sistemas enzimáticos intracelulares necesarios para la utilización de la glucosa. Aunque tanto éste como otros experimentos similares han mostrado que un transporte de glucosa defectuoso es, ciertamente, el principal defecto del metabolismo de la glucosa en los animales diabéticos, se ha hallado también que existe un exaltado ritmo de la gluconeogénesis. Esto viene indicado por la aparición de cantidades incrementadas de nitrógeno extra en la orina (principalmente en forma de urea) de los animales diabéticos, especialmente después de la administración de mezclas de aminoácidos. La comparación del incremento de nitrógeno excretado con la glucosa que aparece en la orina, indica que los esqueletos carbonados de los aminoácidos glucogénicos se convierten casi por completo en glucosa. Esta conclusión está confirmada por los experimentos en los que se alimenta con átomos marcados a animales diabéticos; una gran parte del isótopo se recupera en la glucosa excretada.

Otra gran distorsión del metabolismo de la glucosa en la diabetes consiste en el cese casi completo de la conversión de la glucosa en ácidos grasos por la vía del Acetil-CoA. Tal vez hasta un tercio del total de glúcidos ingeridos pueden convertirse en ácidos grasos y, por tanto, en triglicéridos, en el hígado y en los depósitos de grasas de los animales normales. La aceleración de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y la inhibición de

En los animales diabéticos, la glucosa oxidada como combustible es relativamente baja, excepto en el cerebro. El resto de los tejidos queman una gran cantidad de grasa, especialmente el hígado, donde la cantidad de Acetil CoA formada a expensas de los ac. grasos excede la capacidad del ciclo de los ac. tricarbóxilicos para oxidarla. El exceso de Acetil CoA se convierte en cuerpos cetónicos, los cuales pueden aparecer en grandes cantidades en la sangre (cetonemia) y en la orina (cetonuria), en el estado patológico se denominan cetosis.

Todas estas disfunciones metabólicas pueden invertirse por la administración de insulina, la cual hace aumentar el ritmo de eliminación de la glucosa de la sangre hasta sus concentraciones sanguíneas normales, incrementa las cantidades de glucocinasa y fosfofructocinasa y de piruvatocinasa en el hígado, reprime la biosíntesis de las enzimas específicamente requeridas para la gluconeogénesis (disminuyendo así la formación de glucosa a expensas de los aa.), restaura la velocidad normal de conversión de la glucosa en ac. grasos e inhibe la degradación oxidativa de los ac. grasos. Como resultado de todo ello, el nivel de azúcar sanguíneo vuelve a ser normal, desaparece la glucosuria y los cuerpos cetónicos retroceden a sus niveles normales tanto en la sangre como en la orina. La administración de cantidades excesivas de insulina a animales normales o las dosis demasiado elevadas de insulina en los animales diabéticos provocan la caída de azúcar sanguíneo a niveles inferiores a los 80 mg por 100 ml. Las cantidades muy grandes de insulina inducen el choque insulínico, convulsiones y coma, lo que tiene efecto cuando el azúcar de la sangre desciende por debajo de los 20 mg por 100 ml; puede contrarrestarse por la administración intravenosa de glucosa.

La deficiencia insulínica de los diabéticos puede ser debida a varias causas diferentes, tales como una reducción de la cantidad de tejido de islotes, por otra parte normal, una biosíntesis defectuosa de proinsulina, una defectuosa conversión de la proinsulina en insulina, una deficiente liberación de insulina a la sangre como respuesta a un incremento de glucosa sanguínea, una producción de una insulina genéticamente defectuosa o un ele-

vado ritmo anormal de destrucción insulínica. En la diabetes juvenil la cantidad de insulina encontrada en el páncreas es inferior al 5 % de la cantidad normal; si se aumenta la glucosa sanguínea no se induce liberación de insulina significativamente por parte del páncreas. Sin embargo, en la diabetes del adulto, la cantidad total de insulina presente en el páncreas puede ser completamente normal aunque su liberación a la sangre puede estar retrasada como respuesta a una elevada glucemia. Existen múltiples caminos - por los cuales la concentración de insulina activa en sangre, respondiendo a una elevación de la concentración de glucosa sanguínea, puede resultar anormal o insuficiente.

Algunos pacientes diabéticos son resistentes o insensibles a la insulina. En estos casos puede que la insulina no sea deficitaria en ellos, y en vez de esto puede existir una sobreproducción de otras hormonas, tales como la del crecimiento o el glucagón que se oponen equilibrando la acción de la insulina, según un proceso dirigido a mantener la homeostasis glucémica.

¿Por qué razón los diabéticos no solo presentan un defecto en la utilización de la glucosa por los tejidos, sino que están metabólicamente organizados para producir las cantidades máximas de glucosa a expensas de los aminoácidos y evitar que la glucosa se convierta en grasa? Una antigua, y posible correcta hipótesis, es la de que una exacerbada gluconeogénesis y una baja síntesis de grasa constituyen compensaciones biológicas de la falta de insulina. Según este punto de vista la concentración de glucosa en sangre se incrementa para que la deficiencia en su transporte pueda ser superada, permitiendo así la utilización de glucosa por parte de los tejidos periféricos en ausencia de insulina. Por otra parte, la insulina puede constituir una hormona de crecimiento general al promover la entrada de todos los nutrientes en las células, así como su almacenamiento y utilización.(5)

5. Terapéutica y Tratamiento de la Enfermedad

En, general, y como se menciona anteriormente, dentro de la diabetes se pueden establecer subdivisiones, la más simple y didáctica es la distinción entre dos tipos de diabetes: la diabetes

juvenil (que es debido a la falta de insulina y la terapéutica para toda la vida de estos pacientes consiste en la sustitución de su deficiente insulina endógena) y la diabetes del adulto (en donde existe una menor y más lenta respuesta de las células beta a los estímulos de su secreción, lo mismo que a una hipersensibilidad de los órganos efectores de la acción insulínica). (42)

La terapéutica de la diabetes se puede subdividir en; dieta, antidiabéticos orales o insulina. Ninguno de estos tres métodos terapéuticos se excluyen mutuamente. La dieta es la base clave de todas las demás formas de terapéutica de la diabetes, las combinaciones entre insulina y antidiabéticos orales rara vez son necesarias o de utilidad. Una terapéutica de la diabetes queda incompleta si no se complementa con la regulación de la actividad corporal que convenga mantener al paciente individual. Tiene carácter decisivo para el éxito de la terapéutica el inteligente consejo y profunda instrucción que se da al paciente desde el mismo comienzo de la enfermedad. Esta instrucción no consiste solo en cuestiones de dieta y de administración de medicamentos, sino que debería incluir la adecuada información y esclarecimiento de la naturaleza, causas, complicaciones y tratamiento de la diabetes. Es, así mismo, de importancia capital de que el paciente aprenda a realizar por si mismo el control de la glucosuria y cetónuria. Debe ser una meta fundamental en la enseñanza y tratamiento del diabético el hacer que se sienta, a la mayor brevedad posible, independiente de su enfermedad y casi sano. Este contenido solo se logra plenamente cuando el enfermo se familiariza con las peculiaridades de su enfermedad metabólica y sabe adaptarse a ellas. La meta es conseguir que el paciente haga suya la enfermedad y, en cierto sentido, se independice del médico. Desde luego, esto no quiere decir que el paciente deba prescindir de buscar los cuidados médicos. Más bien indica que el paciente deba más bien ayudarse en situaciones de necesidad (hipoglucemia, regulación metabólica durante el período de vacaciones, etc.). (42). (22)

5.1 Insulinas.

Debido a su naturaleza proteica, la insulina es destruida cuando se administra por vía oral. Para una acción óptima en la diabetes es necesario asegurar la uniformidad de la velocidad de absorción de la insulina inyectada. La administración de la insulina en solución, en suspensión coloidal o combinada con ciertas proteínas satisface estos requerimientos por vía subcutánea. La velocidad de absorción aun de una simple solución de insulina cristalina inyectada varía de tiempo en tiempo en un mismo individuo, es tanto más rápida cuanto mayor sea el volumen inyectado, y más rápido por la vía intramuscular que por la vía subcutánea. La vía subcutánea es ligeramente más lenta en el paciente normal que en el paciente diabético que haya estado recibiendo insulina por algún tiempo.

La velocidad de utilización de la insulina puede retardarse por la presencia de proteínas ligadoras en la fracción globulina-gamma las cuales solo aparecen en el suero, tanto en los pacientes diabéticos como en los normales, después de varias semanas o meses de tratamiento con insulina. Estas proteínas desaparecen después de la interrupción del tratamiento. Este poder ligante, aunque usualmente solo es capaz de retener 10 unidades de insulina, puede ligar hasta 1,500 unidades por litro de plasma. Solo se encuentra una gran proporción entre el requerimiento de insulina y el poder ligante. Se ha invocado este fenómeno para explicar, por lo menos en parte, el aumento en la necesidad de insulina en los diabéticos por encima de lo normal teórico calculado en 50 U por día y la verdadera resistencia a la insulina que es de más de 200 U de insulina por día. La resistencia a la insulina a podido ser reducida con la administración de esteroides, pero el cambio en el poder ligante puede no ser paralelo al cambio en los requerimientos de insulina. Además, algunos pacientes con mucha resistencia a la insulina pueden tener considerable cantidad de insulina libre en el suero, lo cual implica la acción de factores periféricos como mecanismo de resistencia en tales pacientes. Otros agentes inhibidores que se han descubierto en el suero en relación con la alergia a la insulina, acidosis diabética, diabetes no tratada, y aun en la albumina del suero normal, pueden contribuir al aumento en los requerimientos de insulina.

Es digno de notarse que la insulina, como lo indica su punto isoeléctrico (5.3), es una proteína ácida; es decir, que en solución libera iones de H^+ y se carga negativamente en el proceso. La adición de una proteína básica cargada positivamente (como globina o protamina) determina que los iones de proteínas cargadas opuestamente se agrupen en partículas mucho mayores que pueden aun participar si son lo suficientemente grandes. En todo caso la absorción de tales sales de globina-insulina o protamina-insulina es mucho más lenta que la de la insulina libre, y este fenómeno tiene un fin útil.

Los efectos de una dosis dada de insulina deben determinarse en condiciones cuidadosamente controladas. Si se permitiera la producción de hipoglucemia (azúcar sanguínea por debajo de 60-70 mg por 100 ml, Folin-Wu) durante tal evaluación, se pondrían en juego factores reguladores viciarían los resultados (12).

Las preparaciones insulínicas comerciales difieren en cierto número de características, como son: la especie animal de la cual se obtienen, pureza, concentración, solubilidad y el tiempo de comienzo y duración de su actividad biológica. (33)

Existen tres tipos principales de preparaciones insulínicas: 1.- de acción corta, con comienzo rápido del efecto; 2.- de acción intermedia y 3.- de acción prolongada con comienzo lento. (Fig. 5.1).

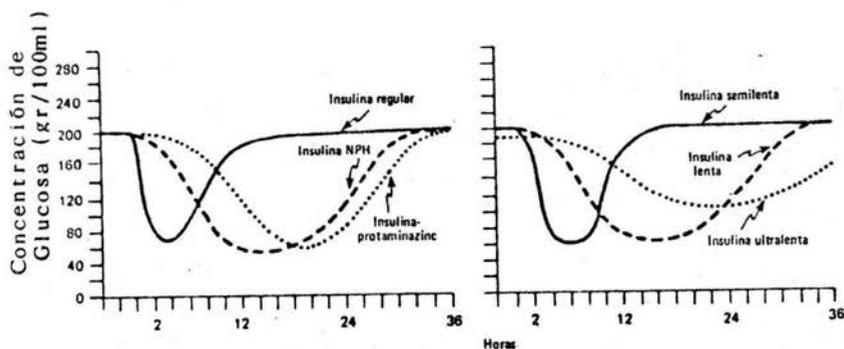


FIG. 5.1 GRADO Y DURACION DEL EFECTO DE VARIOS TIPOS DE INSULINA (Tomado de Katzung, 1984)

Los tipos de insulina corrientemente usados se encuentran en la tabla 5.1

TABLA 5.1 INSULINAS: FUENTES Y ACTIVIDAD

| TIPO DE PRESENTACION | FUENTE ANIMAL | ACTIVIDAD (hrs) | |
|--|---------------------|-----------------|------------|
| | | MAXIMO | DURACION * |
| ACCION RAPIDA Inyección de Insulina USP Regular Cristalina Zn. | Buey, Cerdo ó Mixta | 1/2 - 3 | 5 - 7 |
| Suspensión de Insulina Zinc USP. (Rapida, semi lenta). | Buey, Cerdo ó Mixta | 1 - 4 | 12 - 16 |
| ACCION INTERMEDIA Suspensión Isofan Insulina USP (Insulina NPH). | Buey, Cerdo ó Mixta | 8 - 12 | 18 - 24 |
| Suspensión de Insulina USP (lenta). | Buey, Cerdo ó Mixta | 8 - 12 | 18 - 24 |
| ACCION PROLONGADA Suspensión de Insulina Protamina Zinc USP. - (OZI). | Buey, Cerdo ó Mixta | 8 - 16 | 24 - 36 |
| Suspensión Prolongada de Insulina Zinc USP (ultralenta). | Buey ó Mixta | 8 - 16 | 24 - 36 |

* La duración del efecto aumenta al aumentar la dosis.
(Tomado de : Katzung, G. B. 1984.)

La unidad internacional de insulina se define como la cantidad requerida para abatir la glucemia de un conejo de 2 Kg. en ayunas de 120 a 45 mg por 100 ml. El material internacional de referencia tiene una actividad de 22 U por mg.

Insulina Regular (Insulina Zn Cristalisada)

La insulina regular es una solución de insulina que contiene algo de zinc necesario para la purificación y cristalización, con un pH de 2.5 - 3.5. Produce una disminución casi inmediata del nivel de azúcar de la sangre, el cual alcanza su punto más bajo en aproximadamente tres horas y gradualmente pierde su efecto en 6 - 8 horas. Para una dosis dada de insulina, la disminución del azúcar sanguínea es tanto mayor cuanto mayor haya sido su nivel inicial y existe un paralelismo entre la duración de su acción y la dosis.

Las preparaciones de insulina están envasadas en frascos de 10 ml y se presentan en las formas señaladas en la tabla 5.2.

TABLA 5.2 PREPARACIONES DE INSULINA

| TIPO DE INSULINA | POTENCIA |
|--|----------|
| INYECCION DE INSULINA (Clorhidrato de insulina Regular) | 40, 80 U |
| PROTAMINA ZINC INSULINA SUSPENSION (Inyección de Protamina Zinc Insulina) | 40, 80 U |
| SUSPENSION DE ISOFASE IN SULINA (Insulina NPH) | 40, 80 U |
| INYECCION DE GLOBINA ZINC INSULINA (Globina Zinc Insulina) | 40, 80 U |
| SUSPENSION DE INSULINA ZINC (Insulina Lenta) | 40, 80 U |
| SUSPENSION DE INSULINA ZINC PROLONGADA (Insulina Ultralenta) | 40, 80 U |
| SUSPENSION DE INSULINA ZINC RAPIDA (Insulina semilenta) | 40, 80 U |

(Todas las preparaciones existen en varias - concentraciones, la insulina U - 40 contiene 40 unidades / ml. La U - 80 contiene 80 unidades / ml) (Tomado de : Drill, A. V. 1974.)

La insulina regular es la única preparación que se puede aplicar intravenosamente y así se usa en el tratamiento de acidosis diabética. También se emplea con fines de exploración y en el tratamiento del coma insulínico, principalmente para efectuar un mayor control del nivel del azúcar sanguíneo después del desayuno (o comida) junto con otros tipos de insulina.

Globina-Zn-Insulina.

Es una sal de insulina y globina. Al prepararla, se agregan a cada 100 U de insulina cristalina 3.8 mg de globina extraída de eritrocitos de buey y 0.3 mg de Zn. La solución que resulta es clara y estable, con un pH de 3.7, cercano al de la insulina regular. Comienza a actuar de dos a tres horas después de la inyección y alcanza su máxima acción en menos de ocho horas, y sostiene su acción durante cerca de 16 horas. La duración del efecto, es menor de 24 horas, puede ser una desventaja para los animales anormalmente altos de azúcar sanguínea en ayunas en el paciente más intensamente diabético. (La insulina globina cuando se inyecta, la solución es neutralizada en los tejidos y el complejo insulina-proteína precipita).

Protamina-Insulina

La protamina-insulina es una solución de insulina cristalina combinada con la proteína boricá protamina en una solución amortiguada a un pH de 7.2. Floccula como una suspensión fina que contiene 1.25 mg de protamina por 100 U de insulina. Cuando se introduce por vía subcutánea su disociación y absorción son lentas, dando una acción prolongada de más de 12 horas.

Suspensión de Protamina-Zn- Insulina (Inyección de Protamina-Zn-Insulina) (PZI).

La adición de cloruro de zinc en proporción de 0.2 g - por 100 unidades de protamina-insulina estabiliza la preparación y previene la formación de grumos. Esta preparación, protamina-Zn-Insulina también tiene una acción aun mas prolongada y uniforme su efecto es muy poco intenso y no es inmediato, no comienza a -

actuar antes de dos horas, pero se prolonga por mas de 24 horas. La insulina es liberada de la protefna por las enzimas proteolfticas, dando por resultado un efecto sostenido prolongadamente.

Suspensión de Isofane-Insulina (Insulina NPH)

Esta preparaci3n es un ejemplo de un tipo de insulina con acci3n intermedia. Es una suspensi3n de una forma cristalina de protamina-Zn-Insulina que es casi neutra (pH 7.2) y contiene 0.40 mg de protamina por cada 100 unidades. Esto es justamente suficiente para ligar la insulina regular. Su acci3n es similar a la de una mezcla que contenga una parte de protamina-Zn-Insulina y dos partes de insulina regular. Por esto, tiene una acci3n rapida e intensa que se inicia en cerca de dos horas, alcanza un m3ximo de actividad en cerca de 12 horas y se desvanece al final de 24 horas. La falta de exceso de protamina en este compuesto permite que la insulina regular retenga su acci3n intensa cuando se le mezcla.

Insulinas Lentas.

Hallas-Moller y col. reinvestigaron el efecto de la amortiguaci3n qufmica sobre la acci3n de los cristales de la insulina-Zn. Encontraron que la simple sustituci3n de un acetato por el amortiguador usual de fosfatos hacia insoluble la insulina-Zn a un pH de 7.2 y prolongaba su acci3n. Produjeron dos variaciones del tama1o de los cristales de insulina y encontraron que este factor afectaba tambi3n la duraci3n de la acci3n: cuanto mayor el tama1o, m3s prolongada y menos intensa la acci3n. Ellos denominaron a estas modificaciones ffsicas suspensiones de Insulina Ultra lenta y Semilenta. La acci3n de la ultralenta es similar a la de la protamina-Zn-Insulina y la semilenta por su efecto cae entre la insulina regular y la Isofane-Insulina (NPH). La insulina lenta es una mezcla de 70 % de insulina ultralenta y 30 % de semilenta, y por sus caracterfsticas de acci3n es similar a la isofane-insulina (NPH). Todos los tipos de insulina lenta pueden mezclarse entre si y con peque1as cantidades de insulina regular con retenci3n de la mayorfa de acci3n original de cada componente.

Suspensión de Insulina Zn, Insulina Rápida o Semilenta.

El comienzo de su acción es a la hora y su duración es de 8 a 12 horas. Las características de su acción son intermedias entre las de la insulina regular y las de la globina-insulina.

Suspensión de Insulina Zn o Insulina Lenta.

Esta preparación se asemeja a la isofane-insulina (NPH) en su tipo de acción, con una duración ligeramente mayor y con un retardo de 10 horas en su acción máxima.

Suspensión de Insulina Zn, Insulina prolongada o Ultralenta.

Esta preparación puede usarse intercambiadamente con la protamina-Zn-insulina cuando se usa sola.

Las insulinas lentas pueden usarse rutinariamente y son particularmente útiles para reemplazar a la NPH en pacientes que sean difíciles de regular, (12), (44).

Complicaciones de la Terapéutica con Insulinas.

Tras la aplicación de insulina pueden surgir fundamentalmente las siguientes acciones secundarias indeseables:

- A) Hipoglucemia- Puede ser consecuencia de un retardo en la ingestión de un alimento, de un ejercicio físico extraordinario o de una dosis excesivamente grande para las necesidades inmediatas. El desarrollo rápido de la hipoglucemia causada por los efectos de la insulina regular originan signos de hiperactividad autónoma, tanto adrenergicos (taquicardia, palpitaciones, diaforesis, ansiedad) como parasimpaticos (nauseas, hambre) que pueden progresar a convulsiones y coma. Todas las manifestaciones de hipoglucemia son aliviadas rapidamente por la administración de glucosa. (15).
- B) Inmunopatología - Por lo menos 5 clases moleculares de anticuerpos anti-insulina pueden ser producidos durante el curso de la terapéutica insulinica en la diabetes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. En estos enfermos se presentan dos tipos principales de trastornos inmunitarios;

1.- Alergia a la Insulina

La alergia a la insulina, hipersensibilidad de tipo inmediato, es una condición rara en la cual la urticaria local o general se debe a la liberación de histamina de los mastocitos tisulares sensibilizados por anticuerpos IgE anti-insulina.

2.- Resistencia Inmunitaria a la Insulina.

Todos los enfermos tratados con insulina desarrollan un título bajo de anticuerpos IgG circulantes anti-insulina que neutralizan lentamente la acción de dicha hormona pancreática. Esto produce requerimientos extremadamente altos de la hormona a menudo más de 200 U al día. (48) (60)

- C) Lipodistrofia.- En los sitios de inyección (formación de lipomas) pueden presentarse atrofia o hipertrofia del tejido adiposo subcutáneo que conducen a la formación de escamas (33).
- D) Anomalías de Refracción Transitoria.
- E) Edemas insulínicos.

5.2 Hipogluceantes Orales.

Aunque se han investigado muchos agentes orales para el tratamiento de la diabetes, la primera droga clínicamente importante fué una diguanidina, el Sintalin. Era un derivado de una guanidina con propiedades hipogluceantes (pero también tóxicas) en animales, ensayado en 1918. El Sintalin A y el B fueron introducidos en 1926 pero se abandonaron pocos años después por sospecha de hepatotoxicidad (probablemente infundida) su acción farmacológica era similar a la del grupo no tóxico de las biguanidinas más nuevas que están ahora en uso corriente. La serie de drogas de las sulfonilureas se originó en 1930 en un intento por mejorar la acción del Sintalin mediante la incorporación de azufre a su estructura, en razón a que se había demostrado que formaba parte de la molécula de insulina. Más tarde, los investigadores Franceses Janbon y Loubatieres (1942) estudiaron la acción de un grupo de derivados del Tiadiazol tanto en animales como en el hombre; y en 1955 las drogas sulfonilurea fueron orgánicamente y usadas en

pacientes diabéticos en Alemania. Las primeras dos introducidas - fuerón la Carbutamida y la Tolbutamida; la Clorpropamida fué la 3^a. La primera nunca se usó oficialmente debido a reacciones tóxicas ocasionales. La forma biguanidina en uso comun es la Fenitibiguani dina (Fenformin).

5.2.1. Sulfonilureas

En 1955 las sulfonilureas empezaron a ser utilizadas en el tratamiento de diabéticos no dependientes de insulina. Los com

uestos son arilsulfonilureas con sustituciones en los grupos ben ceno y urea. En la tabla 5.3 se muestran las estructuras químicas de las sulfonilureas y compuestos relacionados.

TABLA 5.3 SULFONILUREAS

| Sulfonilurea | Estructura química | Dosis diaria | Duración del efecto (horas) |
|---|--------------------|--|-----------------------------|
| Tolbutamida (Orinase) | | 0.5-2 g en dosis divididas | 6-12 |
| Tolazamida (Tolinase) | | 0.1-1 g como dosis única o en dosis divididas | 10-14 |
| Acetohexamida (Dymelor) | | 0.25-1.5 g como dosis única o en dosis divididas | 12-24 |
| Clorpropamida (Diabinese) | | 0.1-0.5 g como dosis única | Más de 60 |
| Gliburida* [Glibenclamide]* (numerosos productos) | | 0.0025-0.02 g | 10-24 |
| Glipicida* [Glydiazinamide]* (Glibenese, Mindiab, Mino-diab)* | | 0.0025-0.02 g | 3-8 |

* En otros países, no en E.U.A.

(tomado de: Katzung, G.B. 1984.)

Mecanismo de Acción

Por lo menos tres mecanismos de acción de las sulfonilureas han sido propuestos:

1.- Liberación de Insulina en las Células Beta.

Cuando la terapéutica comienza, la liberación de la insulina preformada es estimulada por la sulfonilurea por medio de un mecanismo desconocido. La síntesis de esta hormona no es estimulada y hasta puede ser reducida. La liberación de la insulina en respuesta al estímulo fisiológico mayor - la glucosa - es acelerada. Sin embargo, hay evidencia de que después de una terapéutica prolongada con sulfonilureas, las concentraciones sericas de insulina ya no son aumentadas por el agente, e inclusive pueden disminuir. Esta observación se complica por el hecho de que la mayoría de las informaciones son obtenidas de las pruebas de tolerancia a la glucosa oral - una medida no fisiológica de la respuesta pancreática a una carga de glucosa -. Después de ingerir alimentos mixtos que contengan tanto proteínas como CHO el efecto benéfico del tratamiento crónico con sulfonilureas por lo general se relaciona con un aumento de los niveles de insulina serica.

2.- Reducción de las Concentraciones Sericas de Glucagon.

En la actualidad se ha establecido que la administración crónica de las sulfonilureas a diabéticos no dependientes de insulina reduce la concentración serica de glucagon. Este fenómeno podría contribuir al efecto hipoglucemiante de los agentes. Aun no se ha establecido el mecanismo para este efecto - supresor, pero puede comprender una acción directa sobre la secreción de las células Alfa o una respuesta homeostática indirecta para incrementar la liberación de insulina o su eficacia.

3.- Aumento en el Número de Receptores para Insulina.

Existen pruebas de un aumento en la fijación de insulina a los receptores tisulares durante la terapéutica con sulfonilureas. Un incremento en el número de receptores puede elevar el efecto logrado con una determinada concentración; tal acción por las sulfonilureas potenciarían el efecto de la insu-

lina, tanto del enfermo, aunque su concentración fuera baja, exógena. Sin embargo, en los diabéticos jóvenes dependientes de insulina que no poseen secreción endógena de dicha hormona, la terapéutica con sulfonilureas todavía no ha demostrado mejorar el control de la glucosa sanguínea o incrementar la sensibilidad de la insulina administrada.

5.2.2. Biguanidas

Las fórmulas básicas y las fórmulas estructurales se encuentran en la tabla 5.4:

TABLA 5.4. BIGUANIDAS

| Nombre genérico (nombre comercial) | Nombre químico y fórmula estructural |
|------------------------------------|---|
| Guanidina | Guanidina $\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ |
| Sintalín | Diguanidinas Decametilenodiguanidina $\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{10}-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ |
| Sintalín B | Dodecacetilenodiguanidina $\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ |
| Ferromín (DBI) | Biguanidas Fórmula estructural básica $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R}-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-\text{C}=\text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{NH} \end{array}$ |
| Silubin, Buformin (W 37, DBV) | Fenetilformaminourrea $\text{C}_6\text{H}_5-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ |
| Metformin, Glucofago (La 6023) | N ¹ -n-butilbiguanida $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ N ¹ ,N ^{1'} -dimetilbiguanida $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{NH}-\text{C}=\text{N}-\text{C}=\text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{NH} \end{array}$ |

(tomado de: Drill, A.V. 1981)

La Fenetibiguanidina (Fenformin DBI) es un polvo cristalino blanco. La sustitución de un grupo butilo o un grupo dimetilo aumenta la dosis efectiva necesaria, pero tales cambios estructurales no modifican significativamente la potencia real. (12)

Todavía no se obtiene una explicación del mecanismo de los efectos de las biguanidas. Su acción sanguínea de reducción de la glucosa no depende de la presencia de células Beta pancreáticas funcionales. La glucosa no disminuye en los sujetos normales después de una noche de ayuno, pero la glucosa sanguínea postprandial es considerablemente menor durante la administración de fenformin. Los enfermos con diabetes de comienzo en la edad adulta tienen hiperglucemia de ayuno considerablemente menor, así como hiperglucemia postprandial después de la administración de biguanidas; sin embargo, esencialmente se desconoce la hipoglucemia durante el tratamiento con estos agentes. Por lo tanto, los medicamentos podrían denominarse en forma más apropiada "euglucémicos" más que agentes hipoglucémicos. Los mecanismos de acción propuestos en la actualidad para este grupo son: 1.- Estimulación directa de la glucólisis en los tejidos periféricos, con aumento en la remoción de glucosa de la sangre; 2.- Gluconeogénesis Hepática reducida; 3.- Absorción de glucosa a menor velocidad en las vías gastrointestinales y 4.- Inhibición de las concentraciones plasmáticas de glucagón.

El fenformin se une a las proteínas plasmáticas y sus concentraciones oscilan de 100 a 250 mg por ml. Tiene una vida media de 11 horas aproximadamente. El Fenformin es metabolizado por hidroxilación de su anillo bencénico en 30 % aproximadamente y por lo tanto se vuelve inactivo biológicamente; el resto es excretado en la forma activa sin metabolizar. En enfermos con insuficiencia renal el fenformin no metabolizado se acumula y por lo tanto aumenta el riesgo de acidosis láctica, complicación que al parecer se relaciona con la dosis. (12).

5.2.3. Reacciones Adversas de los Hipoglucemínicos Orales.

Las sulfonilureas producen;

- 1.- Pirosis, diarrea, nauseas, dolor abdominal.
- 2.- Confusión, vertigo, atoxia.
- 3.- Granulocitopenia.
- 4.- Ictericia obstructiva.
- 5.- Hipoglucemia (15).

Las biguanidas producen: intolerancia digestiva. Se han descrito particularmente acidosis lactica grave, a veces mortal, cuya fisiopatología es desconocida (15)

En resumen, el mecanismo de acción, vida media, duración del efecto hipoglucémico, dosis y efectos colaterales de las biguanidas y de las sulfonilureas se encuentran en la tabla 5.5.

TABLA 5.5 ALGUNOS DATOS SOBRE LOS HIPOGLUCEMIANTES ORALES.

| Compuesto | Mecanismo de acción | Metabolismo | Vida media (h) | Duración de acción (h) | Dosis (g) | Efectos colaterales |
|----------------|--|--|----------------|------------------------|-----------|--|
| Tolbutamida | Agudo: estimula la secreción de insulina; Crónico: aumenta la sensibilidad de las células B, aumenta la captación tisular de glucosa, disminuye la gluconeogénesis | Oxidación hepática y excreción urinaria | 4-5 | 6-12 | 0.5-3.0 | 3%; GI, hematológicos, piel, hipoglucemia, cardiovasculares, hipotiroidismo |
| Cloropropamida | Igual que la anterior | Excreción urinaria sin alteración | 35 | 60 | 0.1-0.5 | 6%; GI, hematológicos, piel, ictericia colestática, hipoglucemia, hiponatremia y retención de agua, hipotiroidismo |
| Acetohexamida | Igual que la anterior | Reducción hepática al metabolito activo; secreción tubular renal activa | 6-8 | 12-24 | 0.25-1.25 | GI, hematológicos, piel, hipoglucemia, hipotiroidismo |
| Tolazamida | Igual que la anterior | Metabolismo hepático y excreción urinaria | 6-8 | 12-24 | 0.1-0.75 | GI, hematológicos, piel, hipoglucemia |
| Fenformina | Disminuye la absorción de GI y aumenta la captación tisular de glucosa | Una tercera parte es hidroxilada por el hígado y dos terceras partes se excretan sin cambio por la orina | 3-5 | 6-8 | 0.05-0.15 | Principalmente GI; acidosis láctica rara en ausencia de enfermedad renal |

(tomado de: Jubiz, W. 1981.)

6. Etnofarmacología en México.

En México, tenemos un enorme y diverso caudal vegetal, gracias a su geografía, a la gran variedad de climas, además de sus características edáficas tan diversas. Por otra parte la tradición médico popular que a través de los siglos se ha mantenido viva y forma una parte muy importante en la cultura de nuestro país.

Actualmente se conocen alrededor de 21 especies de plantas que se utilizan en México para el tratamiento de la diabetes; estas son: Acronomia mexicana, Bidens leucantha, Bidens pilosa, Cacalia decomposita, Calamintha macrostema, Capraria biflora, Cecropia optisifolia, Coutarea latiflora, Eucalyptus glubulus, Eysenhardtia polystachya, Loeselia mexicana, Permantiera edulis, Psittacanthus calyculatus, Salpianthus arenarius, Tecoma stans, Turnera diffusa, Valeriana mexicana, Valeriana officinalis, Valeriana edilis, Verbesina crocata, Verbecina percifolia. (10) (11)

En 1984 se realizó un bioensayo con las plantas antes mencionadas para verificar su efecto hipoglucemiante (51). En esta investigación los resultados indicaron que de las 21 plantas solo 9 presentaron dicho efecto. Las especies activas son las siguientes: A. mexicana, C. macrostema, C. biflora, C. optusifolia, C. latiflora, P. calyculatus, S. arenarius, T. stans, y T. difusa.

No obstante, el crecimiento de la industria farmacéutica en la actualidad y de la enorme producción de medicamentos de síntesis, el interés por las plantas medicinales persiste y además ha surgido un gran entusiasmo por la herbolaria, empleándose cada vez con mayor frecuencia medicamentos elaborados con hierbas medicinales. Sin embargo, las investigaciones dirigidas hacia el aislamiento de los principios activos hipoglucemiantes y sus efectos farmacológicos y toxicológicos es casi nula. Es necesario tomar en cuenta que los preparados vegetales en algunos casos pueden ser más tóxicos que las contraindicaciones de los fármacos fabricados sintéticamente, debido al desconocimiento de los compuestos presentes en los preparados vegetales, razón por la

cual es necesario realizar más investigaciones en relación a este problema. (34) (41) (50)

El conocimiento médico popular necesita de una valoración detallada que le permita encontrar el tratamiento donde la medicina tradicional ocupe el lugar que le corresponde, al mismo nivel de los conocimientos científicos lo cual se reflejaría en beneficio de la salud de nuestra población.

Esta dura tarea será posible llevarla a cabo, después de un profundo análisis de toda la información que durante siglos se ha venido acumulando sobre las plantas medicinales, sus usos, sus características, así como la investigación de los fármacos que potencialmente se pueden aislar de ellos.

Como se mencionó anteriormente, en la herbolaria tradicional de nuestro país, existen vegetales que se han utilizado como agentes hipoglucemiantes, una de estas plantas es Salpianthus arenarius, comúnmente conocida como Azozucar (Rincón de la Vía - Guerrero), Zazucar (Tierra Colorada, Guerrero); Catarinilla, Catarina, etc. Esta planta es miembro de la familia de las Nictaginaceas, es una planta dicotiledonea en forma de arbusto y mide de 1.0 a 1.5 metros de altura; presenta un gran número de inflorescencias, sus pétalos son delgados al igual que sus hojas, las cuales presentan una forma lanceolada y un color verde brillante; los racimos de flores se encuentran en gran abundancia; el fruto es suborbículo dentro del cual las semillas están comprimidas y son de color negro, lustrosas y lisas. Esta planta se localiza en las regiones arenosas marítimas del Pacífico. Se han encontrado especímenes en Tuxpan, Jalisco, Colima, Guerrero, Oaxaca, en la Región del Totolapan, Tehuantepec y Michoacán. En estos lugares también es usada contra los piquetes de alacran.

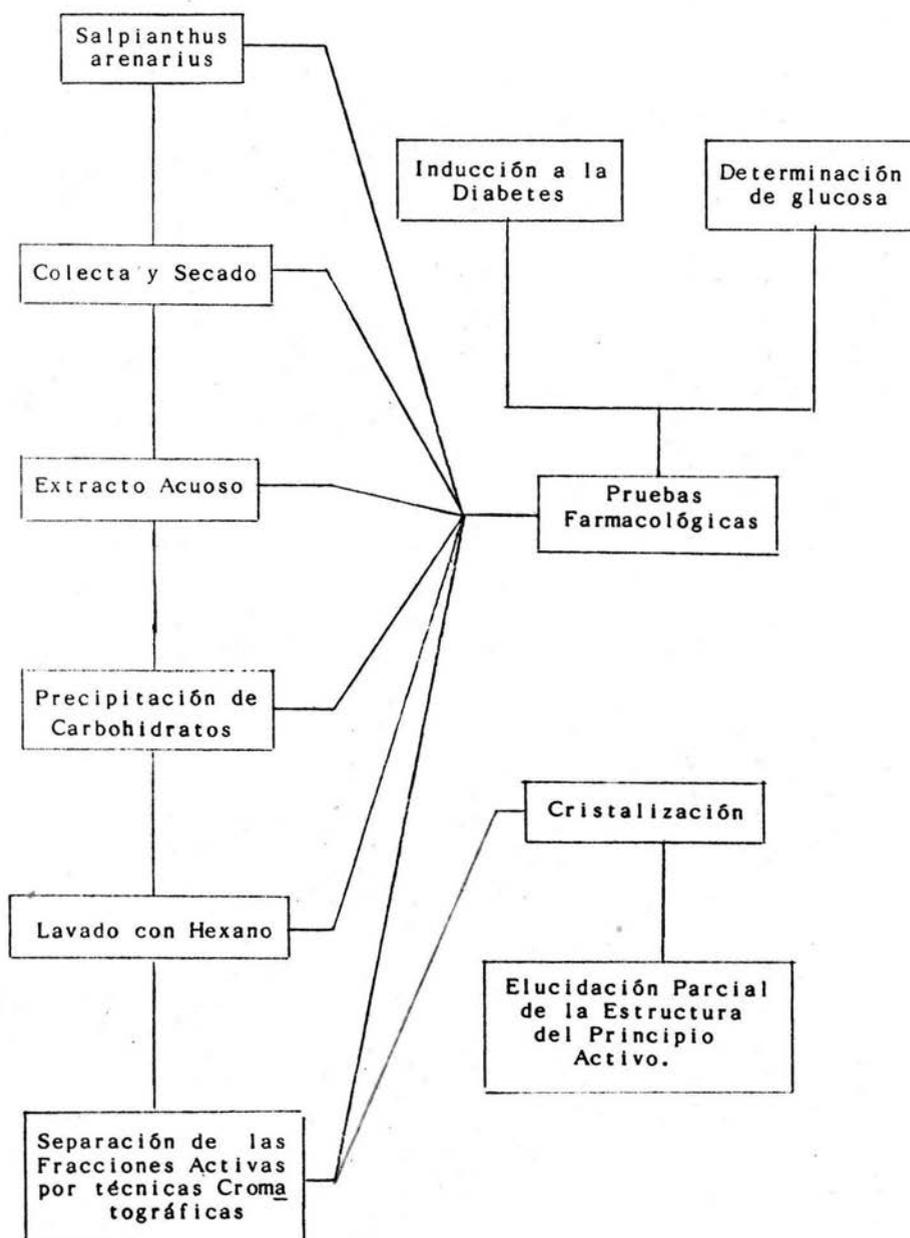
Para su uso como antidiabético el pueblo prepara infusiones acuosas de las hojas y del tallo (secos) de la planta y las consume oralmente como agua de uso. (11) (20)
(Cabe aclarar que sobre esta planta no se han realizado estudios Botánicos y solo se cuenta con la descripción antes mencionada).

7. OBJETIVOS

- 1.- Verificar el efecto hipoglucemiante de los extractos acuosos de la planta Salpianthus arenarius.
- 2.-Purificar y Aislar el o los principios activos responsable (s) del efecto.
- 3.- Elucidar parcialmente la estructura del o los compuesto (s) con actividad biológica.

IV PARTE EXPERIMENTAL

1. Diagrama de Investigación

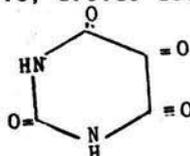


2. Material y Métodos.

2.1 Inducción a la Diabetes por Medio de Aloxana.

Este experimento fué realizado con ratones cepa CD₁ machos, con un peso promedio de 22 a 25 gramos cada uno. [La determinación de glucosa se realizó por medio del método de la Glucosa oxidasa.] Los ratones se dividieron en lotes de 5 animales cada uno. Los animales experimentales fuerón tratados con Aloxana (Merck) disuelta en agua (6l), admisnistrada por vía intraperitoneal a una dosis de 150 mg/kg. de peso corporal cada 72 horas durante 21 días. Al cabo de 504 horas se determinó la glucosa en sangre a los ratones; aquellos que presentaron hiperglucemia (100 mg/100 ml o más de glucosa) se tomaron para los bioensayos, cuidando estandarizar cada uno de los lotes experimentales. (53)

La aloxana es un cuerpo símple, uréido del ácido mesoxálico de estructura pirimídica:

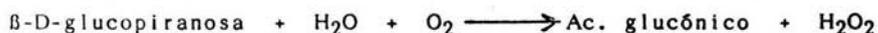
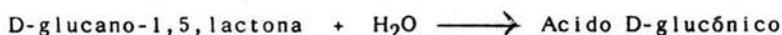
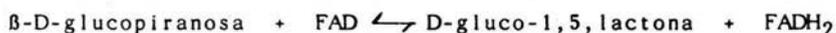


En el año de 1943, se demostro que la aloxana provoca necrosis de las células beta en los islotes pancreáticos, (esta acción no es específica, ya que a dosis elevadas es capaz de provocar daños a nivel de los tejidos hepático y renal).

2.2 Determinación de Glucosa en Sangre

La glucosa oxidasa es una enzima que se encuentra en el medio de crecimiento de Penicillium notatum y cataliza la oxidación de β -D-glucopiranososa a D-glucano-1,5-lactona con la formación de peroxido de hidrogeno; la lactona es luego hidrolizada lentamente a acido D-glucónico. La enzima es específica para la β -D-glucopiranososa, pero la mayoría de las preparaciones de la enzima contienen mutarrotasa, que cataliza la interconversión de las formas α y β . La D-manosa y la D-xilosa son también oxidadas por la enzima pero a velocidades de aproximadamente 1/100 de la

correspondiente a la D-glucosa. El método es por lo tanto altamente específico para la glucosa. En la mezcla de reacción se incluye también peroxidasa y o-toluidina; la enzima libera oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno y reacciona con la o-toluidina para dar un color azul. La reacción es rápida a temperatura ambiente pero el color es inestable, el tiempo más conveniente para hacer las lecturas es de ocho minutos, pero debe ser verificado mediante la solución patrón de glucosa.



Materiales:

1. Sulfato de Zinc heptahidratado, 100 g/l
2. Sulfato de sodio isotónico (93 m mol/l)
3. Reactivo de sulfato de sodio y sulfato de zinc (se diluyen 55 ml de sulfato de zinc a un litro de la solución de sulfato de sodio)
4. Hidróxido de sodio (0.5 mol/l)
5. Amortiguador de acetato (0.15 ml/l, pH 5.0)
6. Solución de glucosa oxidasa (Fermcozyme de Hughes y Hughes)
7. Peroxidasa (1 mg/ml)
8. O-toluidina (10 g/l en etanol absoluto, en botella oscura)
9. Reactivo combinado de o-toluidina: 150 ml de amortiguador de acetato y 1 ml de glucosa oxidasa, 1 ml de peroxidasa, 1 ml de o-toluidina. La preparación es activa por varias semanas si se guarda en una botella oscura a 4* C.
10. Patrón de glucosa (0.1 g/l)
11. Espectrofotómetro.

Procedimiento:

En un tubo de centrifuga se colocan 1.8 ml del reactivo de sulfato de sodio - sulfato de zinc y se añaden 0.1 ml de la muestra (sangre que se extrae de los ratones). Se añade 0.1 ml de hidroxido de sodio, se centrifuga y se toma 1 ml del sobrenadante.

Blanco: 1 ml de agua destilada.

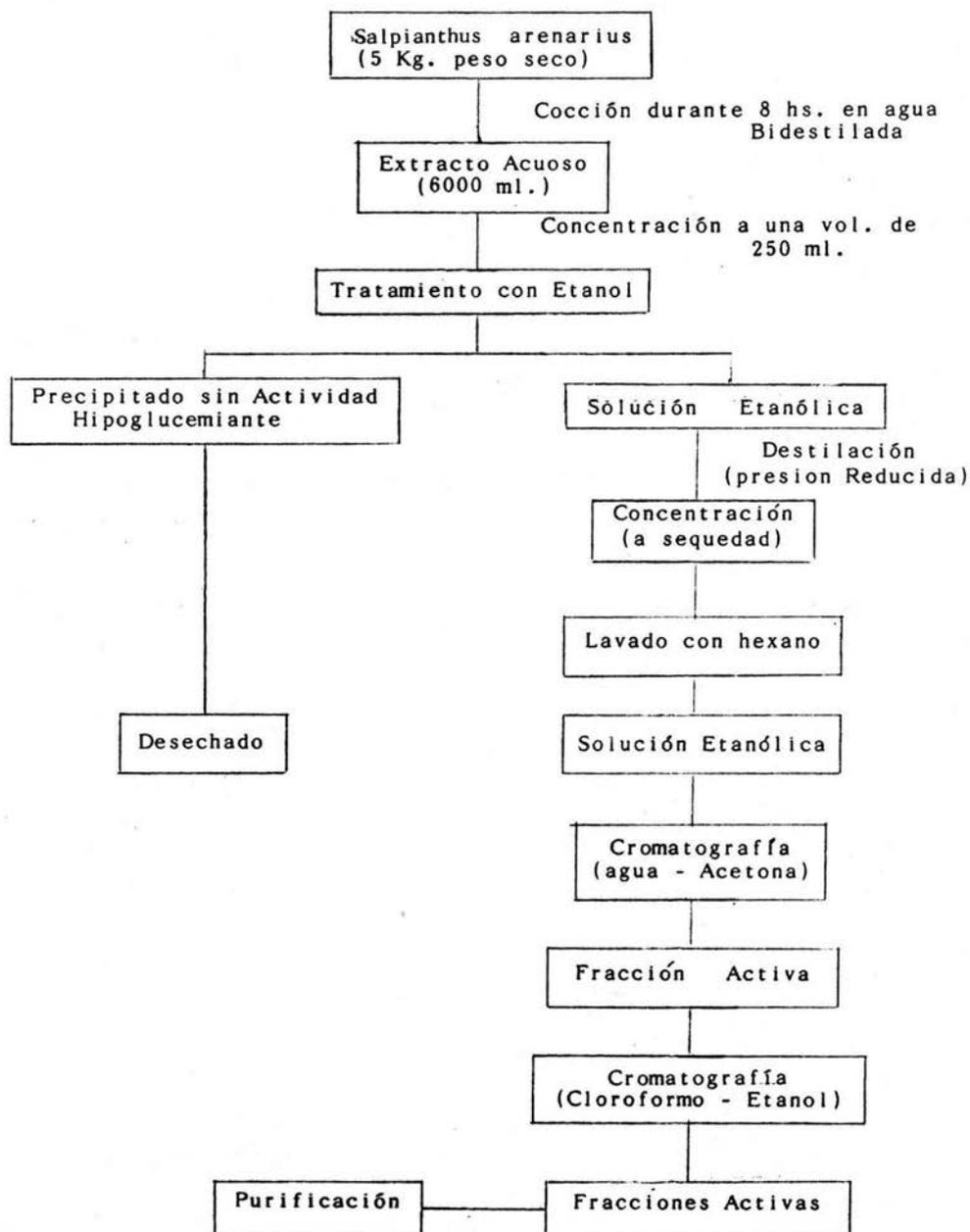
Patrones: 1 ml de la solución de glucosa de concentración adecuada.

Se agregan 5 ml del reactivo combinado de o-toliudina y se mezclan vigorosamente. Se dejan reposar los tubos por ocho minutos exactamente y se lee el color a 625 nm. (53). (57)

2.3 Administración del Problema

Los extractos, así como cada una de las fracciones se administraron por vía intraperitoneal, en el caso del extracto acuoso se preparó una infusión con 50 g de la planta seca en 200 ml de agua destilada. Por lo que se refiere a los demás extractos, así como a cada una de las fracciones se prepararon soluciones concentradas de cada una de ellas. En todos los casos se administró 0.5 ml de las soluciones a cada ratón. A los ratones testigos se les administró 0.5 ml de agua destilada. Los lotes de ratones estaban conformados por 5 individuos, alimentados con alimento Purina. Durante el experimento se les retiró el alimento.

2.4 Diagrama de Flujo



2.5 Colecta y Secado

La planta Salpianthus arenarius se colectó en las cercanías de la cabecera Municipal Ario de Rosales, Michoacán durante el mes de mayo de 1983. Dado que la planta se presenta en las regiones arenosas marítimas del Pacífico, se eligió esta localidad por que en ella es donde más se utiliza como agente hipoglucemiante. (11).

Las características de la zona son las siguientes:

Ario de Rosales se encuentra situado en la vertiente occidental de la Sierra que se extiende al Sur del Lago Zirahuén. Unos kilómetros al sur pasa el Río Sta. Casilda, que se une al del Marqués; tributario del Tepalcatepec, afluente del Río Balsas.

Altitud: 2,050 m sobre el nivel del mar

Latitud: 19° 12' 17" N

Longitud: 101° 42' 55" O

Clima: Templado con lluvias durante el Verano y principios de Otoño.

Se colectaron 20 Kg. tallos y hojas (peso húmedo). Algunos ejemplares de hojas y tallos se secaron en prensas para su posterior identificación; los ejemplares restantes se secaron a la sombra durante 25 días. El material seco se molió en un molino de cuchillas con el objeto de obtener una mayor superficie de contacto durante la extracción.

2.6 Aislamiento del Principio Activo.

Se extrajeron a temperatura de ebullición 5 kg. de hojas y tallos (peso seco) durante 8 horas en 6.0 litros de agua bidestilada; el extracto resultante se filtró usando fibra de vidrio. El extracto acuoso se concentró a un volumen de 250 ml, a éste concentrado acuoso se le añadieron 500 ml. de etanol con el objeto de precipitar los $C_6H_{12}O_6$, los cuales se separaron por filtración. Posteriormente a la solución etanólica (A) y al residuo ciruposo (B) se le determinó su efecto hipoglucemiante. (tabla 1.2)

La solución etanólica (A) se concentró a sequedad bajo

presión reducida en un rotavapor marca Buchi, El residuo ciruposo (B) se desecho.

Reflujo con hexano.

La solución alcoholica se concentro a sequedad a presión reducida, el residuo asi obtenido se colocó a reflujo con hexano (C) con el objeto de eliminar grasas. (tabla 1.3)

Los resultados de los bioensayos se muestran en las tablas. Al final de este proceso se obtuvo un residuo que se disolvió totalmente en 150 ml. de etanol. (D)

2.7 Separación Cromatográfica.

La solución alcoholica se cromatografió en columna húmeda, usando como fase estacionaria Silica Gel 60, de malla --- 70-230 y como fase móvil una mezcla de acetona-agua a una proporción de 1:0.5 v/v; de esta cromatografía obtuvieron 6 fracciones a las cuales se les determino se efecto hipoglucemiante. (ver resultados en tabla 1.4)

La fracción activa se cromatografió bajo las mismas condiciones que la anterior, utilizando en este caso como eluente una mezcla de cloroformo-etanol en una proporción 2:1 v/v. Como resultado de esta separación se obtuvieron 4 fracciones valiendo a repetir las pruebas farmacológicas. (tabla 1.6)

2.8 Purificación

La fracción activa se cromatografió en capa fina de silica gel con el fin de observar el grado de pureza; para ello se emplearon los siguientes sistemas de disolventes:

- a) cloroformo-etanol 2:1
- b) etanol
- c) cloroformo
- d) etanol-acetona 1:1

- e) piridina - agua 4:1
- f) Cloruro de metileno - etanol 1:1

2.9 Elucidación de la Estructura.

El estudio espectroscópico del compuesto puro consistió de los siguientes análisis:

Espectro infra-rojo: En un espectrofotómetro IR Beckman modelo Acculab 10.

Espectro de masas: En un espectrómetro de masas Hewlett-Packard GC / MS System Modelo 5993.

V RESULTADOS

72

1. Bioensayos

El extracto acuoso presentó efecto hipoglucemiante, los resultados obtenidos del bioensayo se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 1.1
SERIES a = 2

| T I E M P O (hrs) | I C O N T R O L glucosa mg/100 ml. | II EXPERIMENTAL glucosa mg/100 ml. |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| inicial | 204.50 | 210.30 |
| 2 | 195.40 | 120.50 |
| 4 | 195.40 | 40.80 |
| 6 | 197.80 | 55.90 |
| 8 | 199.50 | 80.40 |
| suma total = $\sum Y$ | 992.60 | 507.90 |
| media = \bar{Y} | 198.52 | 101.58 |
| suma de los Y cuadrados = $\sum Y^2$ | 197,107.66 | 69,999.95 |

A los resultados de este bioensayo así como de los siguientes se les realizó un análisis de varianza en su caso especial para dos grupos con tamaño igual de muestra (control y experimental) (1, 65); en todos los casos (se utilizó el mismo número de ratones), se trabajó con un nivel de confianza del 95 % y con 1 y 8 grados de libertad (entre grupos y entre tratamientos) (65). El análisis de varianza para el extracto acuoso y el control se muestra en la siguiente hoja.

1. Gran total = $\sum_M^a \sum_M^n Y =$
 $992.60 + 507.90 = 1,500.50$
2. Suma de los Y cuadrados de las dos series = $\sum_M^a \sum_M^n Y^2 =$
 $197,107.66 + 69,999.95 = 267,107.61$
3. Suma de los cuadrados de los totales de los grupos dividida por n = $1/n \sum_M^a \left(\sum_M^n Y \right)^2 =$
 $(992.60)^2 + (507.90)^2 / 5 = 985,254.76 + 257,962.41 / 5 =$
 $1,243,217.15 / 5 = 248,643.434$
4. Gran total elevado al cuadrado y dividido por el tamaño de la muestra = Término de Corrección = CT = $1/an \left(\sum_M^a \sum_M^n Y \right)^2 =$
 $(1,500.50)^2 / 10 = 225,150.025$
5. Suma de los cuadrados totales = SS total = cant. 2 - cant. 4 =
 $267,107.61 - 225,150.025 = 41,957.585$
6. Suma de los cuadrados de los grupos = SS grupos =
 cantidad 3 - cantidad 4 =
 $248,643.43 - 225,150.025 = 23,493.405$
7. Suma de los cuadrados dentro de grupos =
 S S total - S S grupos =
 cantidad 5 - cantidad 6 =
 $41,957.585 - 23,493.405 = 18,464.18$

TABLA ANOVA

| Fuente de va riación | g. l. | S S | MS = $\frac{SS}{gl}$ | $F_s = \frac{MS_{grupo}}{MS_{dentro}}$ |
|---|------------|-------------|----------------------|--|
| Entre grupos (entre trata - mientos) | a-1 = 1 | 23,493.405 | 23,493.405 | $\frac{23,493.405}{2,308.0225}$ $F_s = 10.1790$ |
| Dentro de gru - pos (error den - tro de series) | a(n-1) = 8 | 18,464.180 | 2,308.0225 | |
| Total | an - 1 = 9 | 225,150.025 | | |

g l = grados de libertad

S S = suma de cuadrados

M S = cuadrados medio

F_s = coeficiente de variación

$$F_{tablas} = F_{.05} (1,8) = 5.32 \quad F_s \text{ experimental} = 10.18$$

Conclusión: Dado que $F_s > F_{.05} (1,8)$ se rechaza la hipótesis nula. Las medias de las dos series son diferentes significativamente; es decir, las dos series difieren en la concentración de glucosa, ya que el extracto acuoso produce un efecto hipoglucemiante.

Los resultados del efecto hipoglucémico de las separaciones siguientes (Solución etanólica A y Residuo ciruposo B) se muestran a continuación, así como sus coeficientes de variación (F_s).

TABLA 1.2

| TIEMPO (horas) | RESIDUO CIRUPOSO B | | SOLUCION ETANOLICA A | |
|-------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------|
| | * CONTROL | * EXPERIMENTAL | * CONTROL | * EXPERIMENTAL |
| Inicial | 193.30 | 190.00 | 200.10 | 208.30 |
| 2 | 190.10 | 193.30 | 199.60 | 120.80 |
| 4 | 190.80 | 193.30 | 199.90 | 45.10 |
| 6 | 192.20 | 192.20 | 200.00 | 50.60 |
| 8 | 192.80 | 190.00 | 200.00 | 74.50 |
| ΣY | 959.20 | 958.80 | 999.60 | 499.30 |
| \bar{Y} | 191.84 | 191.76 | 199.92 | 99.86 |

$$F_s \text{ solución etanólica A} = 10.96$$

$$F_s \text{ Residuo ciruposo B} = 0.007$$

$$F \text{ TABLAS} = F_{.05} (1,8) = 5.32$$

$$F_s \text{ sol. etanólica A} > F_{.05} (1,8)$$

$$F_s \text{ Residuo ciruposo B} < F_{.05} (1,8)$$

En este caso observamos que en el proceso de precipitación, el residuo ciruposo B (principalmente carbohidratos) no presentó efecto significativo por lo cual se siguió trabajando con la solución etanólica A; activa, de esta solución se obtuvo otra separación en dos fases; una soluble en hexano y otra insoluble en hexano.
* glucosa mg/100 ml

luble, los resultados de la administración de estas dos fases se muestran a continuación. (La solución etanólica A se concentró a sequedad para el siguiente tratamiento).

TABLA 1.3

| TIEMPO (horas) | SOLUCION HEXANOLICA C | | FASE INSOLUBLE D | |
|-------------------|-----------------------|----------------|------------------|--------|
| | * CONTROL | * EXPERIMENTAL | * CONTROL | * EXP. |
| Inicial | 194.70 | 195.20 | 199,30 | 203.8 |
| 2 | 192.60 | 190.60 | 197.90 | 115.60 |
| 4 | 192.90 | 163.60 | 197.90 | 41.30 |
| 6 | 194.70 | 194.70 | 198.00 | 60.60 |
| 8 | 194,70 | 194.50 | 198.40 | 75.60 |
| ΣY | 969.60 | 968.60 | 991.50 | 496.90 |
| \bar{Y} | 193.92 | 193.72 | 198.30 | 99.38 |

F_s Solución hexanólica C = 0.044 F_s fase insoluble D = 11.781

F_s tablas = $F_{.05}(1,8) = 5.32$

F_s sol. hexanólica < $F_{.05}(1,8)$ F_s fase insoluble > $F_{.05}(1,8)$

A las seis fracciones diferentes que resultarán como producto de la cromatografía en columna se les determinó actividad hipoglucemiante; en este caso se realizó un análisis de varianza general (ANOVA forma general) (65) obteniéndose una variación general significativa; los resultados se muestran a continuación:

* glucosa mg/100 ml

TABLA 1.4

CROMATOGRAFIA ACETONA - AGUA 1 : 0.5 v/v
glucosa mg/100 ml

| TIEMPO Hr | CONTROL | F-1 | F-2 | F-3 | F-4 | F-5 | F-6 |
|-----------|---------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|
| Inicial | 204.50 | 203.10 | 194.40 | 203.50 | 205.10 | 240.90 | 198.10 |
| 2 | 200.60 | 203.10 | 193.00 | <u>119.60</u> | 203.60 | 239.80 | 190.10 |
| 4 | 200.90 | 202.80 | 179.60 | <u>45.10</u> | 177.30 | 230.10 | 190.00 |
| 6 | 203.30 | 202.80 | 190.30 | <u>57.90</u> | 180.20 | 239.30 | 194.10 |
| 8 | 203.90 | 202.80 | 192.40 | <u>70.30</u> | 199.40 | 240.80 | 197.80 |

$$F_s = 54.025$$

$$F \text{ de tablas} = F_{.05} (7,32) = 2.32$$

$$F_s > F \text{ tablas}$$

Como la F_s es mayor que la F de tablas se rechaza la hipótesis nula. La comparación es altamente significativa; por tanto existe variación entre las fracciones y el control.

Posteriormente, se realizó una prueba ANOVA comparando la F-3 con el control, ya que esta fracción fué la que presentó mayor variación; los resultados son los siguientes:

TABLA 1.5
SERIES a = 2

| TIEMPO (horas) | CONTROL glucosa mg/100 ml | F-3 EXPERIMENTAL glucosa mg/100 ml |
|----------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Inicial | 204.50 | 203.50 |
| 2 | 200.60 | 119.60 |
| 4 | 200.90 | 45.10 |
| 6 | 203.30 | 57.90 |
| 8 | 203.90 | 70.30 |
| ΣY | 1,013.20 | 496.40 |
| \bar{Y} | 202.64 | 99.28 |
| ΣY^2 | 205,327.52 | 66,044.92 |

TABLA ANOVA

| FUENTE DE VARIACION | g l | S S | $M_s = \frac{SS}{gl}$ | $F_s = \frac{M_s \text{ grupo}}{M_s \text{ dentro}}$ |
|---|--------------|-------------|-----------------------|--|
| Entre grupos (entre tratamientos) | a - 1 = 1 | 26,708.224 | 26,708.224 | $\frac{26,708.224}{2,096.875}$ F _s = 12.74 |
| Dentro de grupos (error dentro de series) | a(n - 1) = 8 | 16,775.00 | 2,096.875 | |
| T o t a l | an - 1 = 9 | 227,889.216 | | |

g.l. = grados de libertad

S S = suma de cuadrados

M_s = cuadrados medios

F_s = coef. de variación

F tablas = F_{.05} (1,8) = 5.32

F_s experimental = 12.74

F_s experimental > F_{.05} (1,8)

Se rechaza la hipótesis nula; las medias de los 2 tratamientos son diferentes significativamente, las 2 series difieren en la concentración de glucosa.

Al cromatografiarse la fracción activa (F-3) se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior. Los resultados se muestran a continuación:

TABLA 1.6
CROMATOGRAFIA CLOROFORMO - ETANOL 2:1 v/v

| TIEMPO Hr | CONTROL * | F-1 * | F-2 * | F-3 * | F-4 * |
|-----------|-----------|--------|--------|--------|---------------|
| Inicial | 194.40 | 210.70 | 197.40 | 197.20 | 205.20 |
| 2' | 195.00 | 205.90 | 193.40 | 195.20 | <u>137.20</u> |
| 4 | 196.60 | 210.40 | 195.10 | 195.90 | <u>40.30</u> |
| 6 | 194.20 | 210.40 | 196.50 | 196.20 | <u>54.90</u> |
| 8 | 194.20 | 211.00 | 198.20 | 192.80 | <u>57.40</u> |

* glucosa mg/100 ml

$$F_s = 10.244$$

$$F_{\text{tablas}} = F_{.05}(4, 20) = 2.87$$

$$F_s > F_{\text{tablas}}$$

Como la F de tablas es mucho menor que la F_s la comparación es altamente significativa, se rechaza la hipótesis nula muy por debajo de 5 %, existe variación entre las fracciones y el control. En este caso la fracción F-4 fue la que provocó el efecto hipoglucemiante, la comparación de este efecto entre el control y la fracción 4 se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 1.7

SERIE a = 2

| TIEMPO (horas) | CONTROL glucosa mg/100 ml | F-4 EXPERIMENTAL glucosa mg/100 ml |
|----------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Inicial | 194.40 | 205.20 |
| 2 | 195.00 | 137.20 |
| 4 | 196.60 | 40.30 |
| 6 | 194.20 | 54.90 |
| 8 | 194.20 | 57.40 |
| ΣY | 974.400 | 495.000 |
| \bar{Y} | 194.880 | 99.000 |
| ΣY^2 | 189,895.2000 | 68,863.740 |

TABLA ANOVA

| FUENTE DE VARIACION | g l | S S | $Ms = \frac{SS}{gl}$ | $F_s = \frac{Ms \text{ grupo}}{Ms \text{ dentro}}$ |
|---|--------------|-------------|----------------------|--|
| Entre grupos (entre tratamientos) | a - 1 = 1 | 22,982.436 | 22,982.436 | $\frac{22,982.4360}{2,482.8592}$ |
| Dentro de grupos (error dentro de series) | a(n - 1) = 8 | 19,862.874 | 2,482.8592 | |
| T o t a l | an - 1 = 9 | 213,913.636 | | $F_s = 9.26$ |

g.l. = grados de libertad

S S = suma de cuadrados

Ms = cuadrados medios

F_s = coef. de variaciónF tablas = F_{.05} (1,8) = 5.32F_s experimental = 9.26 $F \text{ experimental} > F_{.05} (1,8)$

Se rechaza la hipótesis nula; las medias de los dos tratamientos son diferentes, ya que la fracción 4 presenta un efecto hipoglucemiante.

2. Parte Química

La fracción 4 presentó 50 mg de un compuesto amorfo de color amarillento, con un rendimiento del 0.001 %, debido a ello no se realizaron los espectros de UV y Resonancia Magnética de -- Protones. La pureza de la sustancia se determinó por cromatografía en placa fina en varios sistemas de disolventes; en todos los casos se obtuvo una mancha indicándonos una pureza aceptable para realizar el estudio espectroscópico del compuesto.

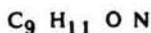
El compuesto hipoglucemiante presentó el análisis elemental siguiente:

| | |
|---|--------|
| C | 72.2 % |
| H | 7.5 % |
| N | 9.2 % |
| O | 11.1 % |

El análisis elemental calculado es el siguiente:

| | |
|---|--------|
| C | 72.4 % |
| H | 7.3 % |
| N | 9.4 % |
| O | 10.9 % |

La fórmula empírica del compuesto es:



con un peso molecular (calculado por espectroscopia de masas) de 149.

El espectro infrarrojo de la sustancia mostro las siguientes bandas: IR $CHCl_3$ $V_{max.} = 3,000, 1,700, 1,620. cm^{-1}$

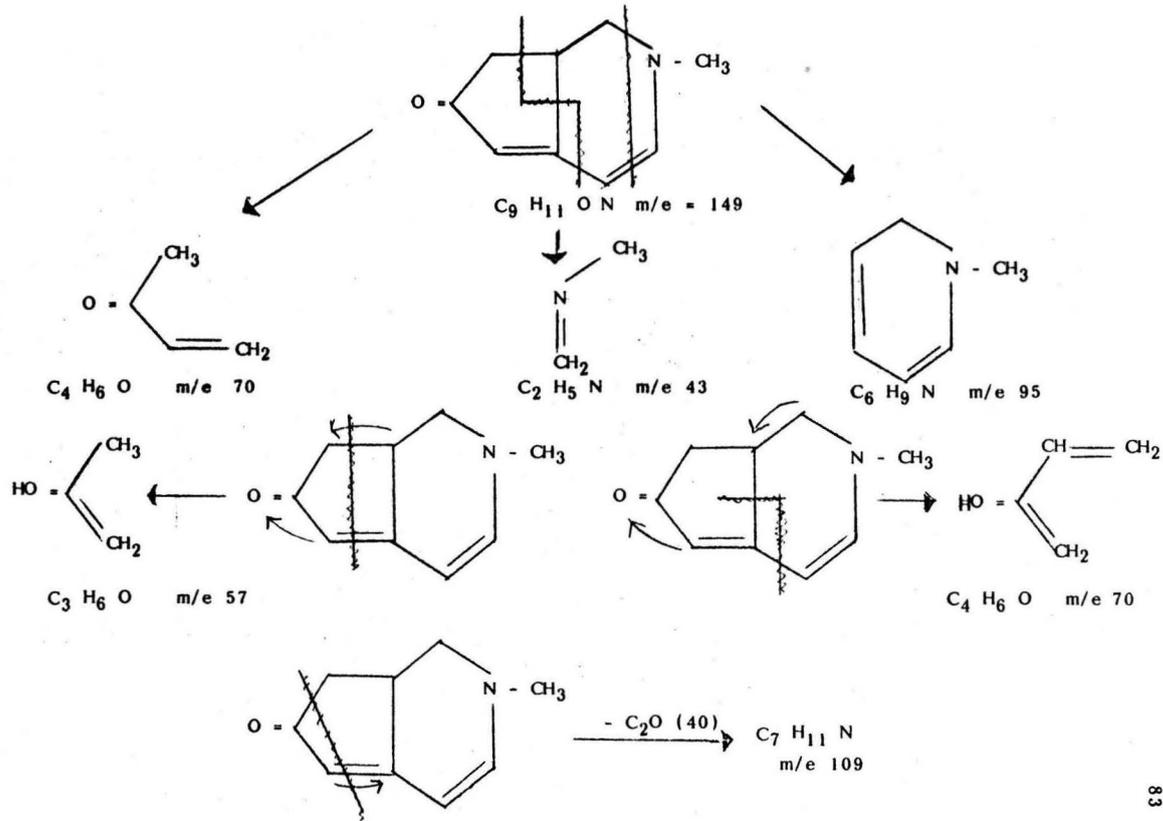
El IR presento dos bandas una de 1,700 y la otra de 1,620 cm^{-1} , aproximadamente de igual intensidad a la de una ciclohexanona. El sistema indica un grupo NH en la región de 3000 cm^{-1} .

Las masas de los iones principales del compuesto de acuerdo al espectro de masas se muestran a continuación:

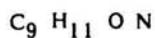
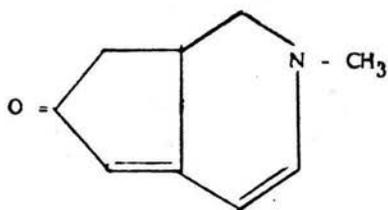
| M A S A | ABUNDANCIA RELATIVA |
|---------|---------------------|
| 149 | 12.50 % |
| 95 | 10.00 % |
| 69 | 20.00 % |
| 43 | 100.00 % |
| 57 | 50.00 % |
| 71 | 25.00 % |

La masa del ion molecular fué de 149. El mapa de fragmentación propuesto para el compuesto es el siguiente:

MAPA DE FRAGMENTACION



De acuerdo al mapa de fragmentación y a la información espectroscópica recabada (IR y espectro de masas) la estructura propuesta para el compuesto hipoglucemiante es la siguiente:



Al compuesto se le realizaron pruebas de alcaloides utilizando los reactivos de Wagner y Mayer. Los resultados en ambas pruebas fueron positivos.

VI DISCUSIONES

Pocos principios activos hipoglucemiantes de origen vegetal se han aislado e identificado, debido a que este tipo de compuestos por ser metabolitos secundarios, son biosintetizados en muy pequeñas cantidades y su rendimiento al final del proceso es muy escaso. Para la realización del presente trabajo no se contaba con información acerca de las propiedades físicas y químicas del compuesto, el método utilizado fué el de rastrear el principio activo, primeramente conociendo su solubilidad y, posteriormente separandolo por métodos cromatográficos, aunado a esto con sus respectivos bioensayos para comprobar el efecto hipoglucemiante.

Para el tratamiento estadístico de los bioensayos se utilizó el criterio de estandarización usando el método de análisis de varianza. Este, permite comprobar diferencias significativas entre las medias de dos muestras; así como de muchas, (En nuestro caso se presentaron los dos tipos de problemas).

En todos los casos se trabajó con límites de confianza al 95 % (permitido para datos de experimentación biológica). En todos los casos donde se observó un efecto hipoglucemiante la hipótesis alternativa fué la aceptada ya que las variaciones entre el coeficiente de variación (F_s) y el coeficiente de tablas (F_{tablas}) presentaron un amplio rango de diferencia.

En cuanto al aislamiento del compuesto, presento una solubilidad en disolventes polares; esta característica fué aprovechada para darle cierta purificación al extracto activo antes de ser sometido a la separación cromatográfica en donde se utilizaron mezclas de disolventes polares. Al finalizar el proceso obtuvimos un rendimiento del 0.001 % (50 mg), con el cual se realizaron las pruebas espectroscópicas. (Debido al bajo rendimiento no fué posible realizar los espectros de UV, PMNR).

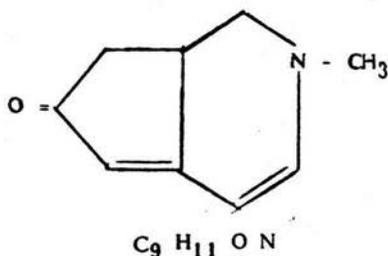
El espectro Infrarrojo de la sustancia mostró dos bandas una a $1,700$ y la otra a $1,620 \text{ cm}^{-1}$ indicándonos la presencia de una ciclopentanona en nuestra molécula. Otra banda fué encontrada a los $3,000 \text{ cm}^{-1}$, nos indica la presencia de un grupo NH.

Para elucidar la estructura química del compuesto se de termino el espectro de masas y el mapa de fragmentación obtenido, coincide con los datos obtenidos en el espectro infrarrojo.

En un futuro se piensa trabajar en el laboratorio sobre la síntesis del compuesto, además de la formación de derivados que confirmen la estructura propuesta; también se piensa trabajar en el estudio farmacológico de este hipoglucemiante y así poder determinar su aplicación futura.

V I I CONCLUSIONES

Salpianthus arenarius posee un efecto hipoglucemiante que es utilizado por la población nacional. Este efecto fué verificado en ratones de laboratorio (Cepa CD₁). El principio activo fué aislado y elucidada su estructura química siendo esta la de un alcaloide heterociclico cuya fórmula estructural es la siguiente:



La estructura de este compuesto no tiene punto de comparación con los hipoglucemiantes ahora conocidos por lo que es imposible ofrecer una explicación de su probable mecanismo de acción.

Para una mayor certidumbre de la actividad reportada de este compuesto aislado, deberán repetirse los estudios de una manera más cuantitativa y cualitativa. Si después de realizar estas pruebas se concluye que el compuesto es realmente efectivo en el tratamiento de la diabetes experimental, y si es factible y/o rentable su síntesis artificial, faltara valorar desde su introducción en un organismo hasta su eliminación; determinando su mejor vía de administración, biodisponibilidad, distribución, mecanismo de acción, vida media y vías de eliminación, así como las DE₅₀, DL₅₀ e índice terapéutico.

Dada la situación actual, se puede pensar que aun es muy temprano para ofrecer un balance definitivo sobre la aportación que puedan dar trabajos como el presente a la quimioterapia. Sin embargo, si se debe remarcar la importancia de la búsqueda de nuevos agentes hipoglucemiantes, ya que la demanda de insulina y de hipoglucemiantes orales no alcanza a cubrir los casos de dia-

betes en nuestro país.

Por último, se ha visto que las compañías que manejan la industria farmacéutica, argumentan que el elevado precio de los medicamentos se debe a que la mayor parte de los países en desarrollo carecen de personal capacitado, del equipo y de la organización especializada, como para garantizar un control de calidad adecuado. México, actualmente produce medicamentos, para cu ya elaboración importa muchos productos intermedios y materias primas. Sin embargo, se realizan pocas investigaciones, ya que las empresas que poseen una parte considerable de la industria farmacéutica en México, son filiales o sucursales que tienen su sede o matriz en los Estados Unidos de América o en Europa.

Actualmente, para no depender en gran medida de las importaciones de productos en formas dosificadas comerciales para satisfacer nuestras necesidades, se está tratando de fomentar el interés para el estudio de las plantas medicinales. De esta manera, se pretende que la industria farmacéutica nacional pueda obtener sus propias materias primas y elaborar sus medicamentos tratando de contrarrestar la subestimación de la riqueza potencial representada por las plantas medicinales aquí existentes, que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, aunque todavía no se haya desarrollado un herbolario sistemático, pese al éxito logrado con varios productos botánicos importantes.

Todo lo que se ha mencionado hasta el momento sobre la medicina tradicional y la herbolaria hacen suponer que pueden llegar a formar parte importante de la medicina social del país, tan también es bueno recordar que además de los efectos farmacológicos atribuidos, en la actualidad es posible obtener una mejor fitoterapéutica debido al progreso en el campo de la producción, mejoramiento, industrialización y conservación de las plantas medicinales.

En épocas anteriores no se podía mantener una constante en lo concerniente al efecto biológico de la planta, ya que depen dían mucho de los factores ecológicos, pero hoy en día todos esos obstáculos, producto de la falta de conocimiento sobre las plan-

tas puede ser superado ya que se pueden cultivar en forma intensiva, mejorarlas por métodos genéticos y de ésta manera lograr una mejor aceptación de la medicina tradicional pues ya contaría con un apoyo científico interdisciplinario.

VIII BIBLIOGRAFIA

1. ALVIN, E. L. (1981). Bioestadística: Sexta Impresión. Cía. Editorial Continental. México, D. F.. México, pp 75-86.
2. BRAWN, J. (1981). La Diabetes Mellitus. Edit. Científico-Médica. España. pp 157-160.
3. BLOODWORTH, J. M. B. (1973). Patología Endócrina. El Manual Moderno, S. A. México, D.F. pp. 248-337.
4. BRAWN, J. (1981). Islet Cells Grow After Transplantation Of Total Pancreas And Control Of Diabetes. Journal of American Diabetes Association. Vol. 30, Núm. 10. pp. 9.
5. BROWNLEE, M. (1981). The Biochemistry of the Complications of Diabetes Mellitus, Ann. Rev. Biochem. Vol. 30, pp. 385-432.
6. CAÑADEL, V. J. P. M. (1973). Libro de la Diabetes. Ed. Rocas Barcelona, España. pp 21-29.
7. CARASI, E. & Luft, r. (1979). Clinical Diabetes and Theories of Pathogenesis. Handbook of Physiology, Section 7 Vol. 1. USA. pp. 627-640.
8. CHAIN, S. J.: TKEIMPI P. & STEINER, D. F. (1976). Cell Free Synthesis of Rat Pre-Proinsulins: Characterization and Partial Aminoacid Sequence Determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 73, pp. 1964-1968.
9. CHAN, M. (1981) Hormone Regulation of Glucose Metabolism in the Genetically Obese-Diabetic Mouse (db/db): Glucose Metabolism in the Perfused Hindquarters of Lean and Obese Mice. Journal of American Diabetes Association, - Vol. 30 Núm. 3. pp 211.
10. DIAZ, J. L. (1976). Monografías Científicas I. Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. IMEPLAN. - México.
11. DIAZ, J. L. (1976). Monografías Científicas II. Usos de las Plantas Medicinales de México. IMEPLAN. México pp. 29 245,270.

12. DRILL, A. V. (1974). *Farmacología Médica*. Prensa Médico Mexicana. México. pp 1267-1294.
13. FELIG, P. & BOXTER, D. J. (1981). *Endocrinología y Metabolismo* Mc. Graw Hill. México. pp. 815-946.
14. FONT-QUER. (1980). *Plantas Medicinales el Dioscórides Renovado*, Sexta Edición. Ed. Labor. España. pp. 397, 760.
15. FREJAVILLE, J. P. BURDEN, R. (1979). *Toxicología Clínica y Analítica*. Editorial JIMS. España. pp 370.
16. GARCIA, G. M. (1968). *Manual de Botánica Medicinal*. E. G. M. México. pp 11, 33, 50, 84.
17. GERBER, P. G. (1981). Glucose and Cyclic AMP as Stimulators of Somatostatin and Insulin Secretion from the Insolated, Perfused Rat Pancreas: a Quantitative Study. *Journal of Am. Diabetes Association*. Vol. 30 Núm. 1. pp 40.
18. GOBERNA, R. (1978). Como se Segrega la Insulina. *Investigación y Ciencia* Núm. 21. pp. 92-103.
19. GOEDEL, P. V., & BOLIVAR, F. et al. (1979). "Expression in *Escherichia coli* of Chemically Synthesized Gemas for -
20. GOMEZ, P. A. (1966). *Estudio Botánicos*. Edic. del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. A. C. México. pp. 132-134.
21. GOODMAN, A. S.; GOODMAN, L. S. y GILMAN, A. (1982). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Sexta Ed. Ed. Editorial Médico Panamericana. México. pp. 1270-1292.
22. GRANADOS, O. J. L. (1983). Tesis: El Proceso Educativo a Diabéticos en Control. *Historia Natural de la Enfermedad*. -- Facultad de Medicina. Universidad Veracruzana, Veracruz. pp. 13-17.
23. GUYTON, A.C. (1977). *Tratado de Fisiología Médica*. Quinta ed. ED. Interamericana. México.
24. HARRISON, et al (1979). *Medicina Interna*. Quinta Ed. La Prensa Médico Mexicana.
25. HODGKIN, D. C. & MERCOLA, D. (1972). The Secondary and Tertiary Structure of Insulin. In *Endocrine Pancreas*. *Endocrinology Handbook of Physiology* Editors Stainer, D. F. & Fremkel N. American Physiological Society Wash. Vol. 1 Sect. 7. USA pp. 139-157.

26. INFORMACION ESTADISTICA SECTOR SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL.
Vol. 3. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México, D. F. 1985.
27. JAWETZ, S. (1979). Farmacología Clínica. Ed. El Manual Moderno S. A. México.
28. JOSLIN, E. P. (1979). "Definición, Diagnóstico, Clasificación, Sintomatología y Pronóstico de la Diabetes". Manual del Módulo de Diabetes. Carrera de Medicina.
29. KARL, E. P. (1969). Endocrinología. Ed. Interamericana. México. pp. 580 - 583.
30. JUBIZ, W. (1981) Endocrinología Clínica. El manual Moderno. México.
31. KANEKO, T. KANETO, A. et al (1979) Insulin and C-Peptide. Editor Baba S. Kunekot., Yanaihara Noborv. Excerpta Medica Amsterdam, Holanda. pp. 138-147.
32. KATSOYANNIS, P. G. et al (1963). Insulin Peptides IX: the Synthesis of the A-Chain of Insulin and its Combination with Natural B-Chain to Generate Insulin Activity. Journal of American and Chemical Society. Vol. 85. pp. - 2836 - 2865.
33. KATZUNG, G. B. (1984). Farmacología Basica y Clínica. El Manual Moderno. México. 479 - 490.
34. KURP, P. N. (1977). "La Gencia de la Vida". Salud Mundial. Nov. 1977 pp. 8 - 14.
35. LATARJET, M. y RUIZ, L. A. (1983). "Anatomía Humana", Editorial Médica Panamericana. Tomo II. Argentina. pp. - 1574 - 1586.
36. LLAMAS, R. (1976). Compendio de Endocrinología. Ed. Francisco Mendez. México. pp 157-223.
37. LEHNINGER, A. L. (1979). Bioquímica. "Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular". Ediciones Omega. España.
38. LUFT, R. (1979). Buenas Perspectivas para el Tratamiento de la Diabetes. Salud Mundial. (OMS). Mayo 1979. pp 2 -7.
39. Markussen, j. 91979). Proteolytic Degradation of Proinsulin & of the Intermediate Forms: Application to Synthesis and Biosynthesis of Insulin. Editor Baba S. Kunekot., Yanaihara Noboru. Excerpta Medica, Holanda. pp 50 - 61

40. MARTIN, W. D. (1984). Bioquímica de Harper. Ed. El manual Moderno, S. A. México. pp 515.
41. MARTINEZ, M. (1979). Catalogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. t. c. e. México. pp 1172.
42. MEHNERT, F. (1977). "Enfermedades del Metabolismo". Ed. Salvat. España. pp. 158 - 289.
43. MEISTAS, T. M. (1981). Correlation of Urinary Excretion of C-Peptide with the Integrated Concentration and Secretion Rate of Insulin. Journal of Am. Diabetes Association. Vol. 30, Num. 8. pp 639-643.
44. MEYERS, F. H.: JUWATS, F. Y GOLFEIN, A. (1977). Manual de Farmacología Clínica. El Manual Moderno, S. A. México. pp. 424 - 440.
45. MILLER, M. A.: LEAVELL, L. C. (1979). Manual de Anatomía y Fisiología. La Prensa Médica Mexicana. 2* Edición México. pp. 555 - 557.
46. NIKI, ATSUSHI, et al (1979). Glucose Regulation of Pancreatic B-Cell for Insulin Release and Biosynthesis. Editor - Baba S. Kunekot., Yanaihara Noboru. Excerpta Medica. Amsterdam, Holanda. pp. 106 - 116.
47. NOTKINS, A. L. (1980). Causas de la Diabetes. Investigación y Ciencia. Enero 1980. Num. 40. pp. 16 - 28.
48. OLEFSKY, M. J. (1981). Insulin Resistance and Insulin Action in Vitro and in vivo Perspective. Journal of Am. Diabetes Association. Vol. 30. Núm 2. pp 142.
49. PENICHE, F. M. (1979). "DIABETES MELLITUS". Semana Médica de México. Vol. XLVI. NUM. (6) 1220. pp. 125 - 129.
50. PENNINGTON, T. D.: SARUKHAN, J. (1968) Arboles Tropicales de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, S. A. G. México, D. F. pp129 - 130.
51. PEREZ, G. R. M. et al (1984). "A Study of Hypogluceemic Rffect of some Mexican Plants. Journal de Ethnopharmacology. Vol 12. (1984) pp. 253 - 262.
52. PEREZ, T. R. (1975). "Patología Molecular subcelular y Celular". La prensa Médica Mexicana. México, D. F.. México pp 143 - 149.

53. PLUMER, D. T. (1981) "Introducción a la Bioquímica Práctica" McGraw - Hill. Colombia. pp 175 - 176.
54. PORTE, J. R. et al. (1981). "Glucose Disposals is not Proportional to Plasma Glucose Level in Man. Journal of Am. - Diabetes Asociation. Vol. 30, Núm. 10. pp. 847 - 850.
55. PRAXIS MEDICA. (1972). Problemas Sociales que Plantea la Diabetes. Alcalá 126. España. Vol. V (5900). pp 1-4.
56. RABKIN, et al. (1981). Metabolic Characteristics of Renal - Insulin Uptake. Journal of Am. Diabetes Asociation. Vol 30. Núm. 11. pp 929-934.
57. REINHOLD, J. G. (1953). Standar Methods of Clinical Chem. New York, Academic Press. Vol 1. pp 88.
58. REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA: La Diabetes Mellitus. Vol. 17. Año 17. pp. 18 - 20.
59. RIBES, G. (1981). Rapid Changes in Calcium Contents of Rat Pancreatic Islets in Response to Glucose. Journal of - Diabetes Asociation. Vol. 30. Núm. 1 pp 52.
60. RIZZE, A. R. (1981). Mechanism and Significance of Insulin - Resistance in non-insulin-dependent Diabetic Mellitus. Journal of AM. Diabetes Asociation. Vol. 30, Núm. 12. pp. 990 - 995.
61. RODRIGUEZ, G. H.; PEREZ, G. C. et al (1975). "Inducción a la Diabetes por medio de Aloxana". Acta Médica. Vol. XI. Núm. 41. México. pp 33 - 36.
62. SANJER, F. (1960). "Chemetry of Insulin". Britain Medical - Bolletín, Vol. 16 pp 183 - 188.
63. SOCRATES, G. (1980). "Infrared Characteristic Group Frecuencias". ED. John Wiley and Sons: Chichester England - pp 27 - 37, 45 - 46, 49, 91 - 96.
64. SOKABE, N. (1979). Insulin Structure in 1.2 A Resolution: - Flexibility of Local Conformation and Surrounding Water Molecules. Editor Baba S. Kunekot., Yanaihara Noboru Excerpta Medica Amsterdam, Holanda. pp
65. SOKAL, R. R. ; ROHLF, J. F. (1979). "Biometría" (Principios y Metodos estadísticos en la Investigación Biológica) H. Blume Ediciones. España. pp 145 - 280.

66. STANDLEY, P. (1958) Trees and Shurbs of Mexico. Smithsonian. Press Contributions from the United States National Herbarium. Vol. 23 Part 2. Washington, D. C. pp 202, 220-222.
67. STANLEY, L. R.; ANGELL, A. (1978). PATOLOGÍA Básica. Ed. Interamericana. 2 ed. México.
68. STEINER, D. F. et al. (1972). "The Biosynthesis of insulin". In Endocrine Pancreas. Editors Steiner, D. F. & Freinkel, N. American Physiological Society. Washington. Vol 1 Sec. 7. pp 175 - 198.
69. STEINER, D. F.; DUGUID, F. D. et al. (1979). New Aspects of Insulin Biosynthesis. Editor Baba S., Kunekot., Yanaiharan, Excerpta Medica. Amsterdam Holanda. pp 9 - 19.
70. STOCKER, W. (1966). "Aportación de la Historia de la Diabetes Mellitus". Ed. Therapiewoche. Argentina. pp 16, 34, 1077.
71. TRUS, D. M. (1981). Regulation of Glucose Metabolism in Pancreatic Islets. Journal of Am. Diabetes Asociation. Vol. 30. Núm 11. pp 911 - 922.
72. ULLRICH, A.; SHINE, J. C. (1979). The Structure and Expression of the Insulin Gene". Editor. Baba S. Kunekot., Yanaiharanoboru. Excerpta Medica. Amsterdam Holanda. pp 20-26.
73. YANAIHARA, N. et al (1979). "Characterizacion of Synthetic Human Proinsulin and C-Peptide. editor Baba S. Kunekot., Yanaiharanoboru. Excerpta Medica. Amsterdam, Holanda. pp. 41 - 49.
74. ZARATE, A. (1981). Introducción a la Endocrinología. Ed. Francisco Mendez Cervantes. México. pp 179 - 306.