



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de dos plantas mexicanas, con actividad  
hipoglucemiante, Cecropia obtusifolia Bertol y Mosannonna  
depressa (Baill) Chatrou, sobre la secreción de insulina en  
ratas diabéticas n-STZ.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G A**

P R E S E N T A :

**ANA LAURA SOTO CONSTANTINO**



**DIRECTOR DE TESIS: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

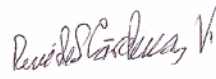
División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:


**"Efecto de dos plantas mexicanas, con actividad hipoglucemiante, *Cecropia obtusifolia* Bertol y *Mosannonna depressa* (Baill) Chatrou, sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ)**


realizado por **Soto Constantino Ana Laura**, con número de cuenta **09833638-4**, quien opta por titularse en la opción **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez 

Propietario M. en C. Abigail Aguilar Contreras 

Tutor(a)  
Propietario Dr. Adolfo Andrade Cetto 

Suplente Dra. María Cristina Revilla Monsalve 

Suplente Biól. Eddy Cuauhtémoc Martínez Zurita 

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Univeritaria, D. F., a 7 de marzo del 2007  
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

  
DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*Este trabajo se lo dedico a mis padres, Olivia y Enrique; y a mis hermanas  
Brenda y Ale por haber compartido una vida conmigo*

Agradezco al proyecto PAPIIT IN 202607-2 e IN 204703-3 por haber financiado este proyecto de investigación.

*Quiero expresar mi agradecimiento :*

*A mi Director de Tesis, Dr. Adolfo Andrade Cetto por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.*

*Al Dr. Rene Cárdenas y a la M. en C. Abigail Aguilar, por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo*

*A la Dra. Ma. Cristina Revilla por sus valiosas críticas*

*Al Biol. Eddy Martinez por su apoyo y revisión de la tesis, y por ser un gran amigo*

*A mis amigos del Laboratorio Jaime, Eddy, Paty, Isabel, Brenda y Lore ,gracias por compartir conmigo.*

*A mis amigos de la FAC. Memo, Karen, Denisse, Bianca, Carlos, Celia, Hugo, Alberto por compartir conmigo esas risas , los recuerdos, las penas y más.*

*A los que conocí en el camino, gracias Amaranta y Astrid por brindarme su amistad.*

*A mis amigos de la prepa por enseñarme a soñar de una manera diferente gracias Dulce, Tania, Juan Carlos, Joel, Cesar.*

*Y a ti Pepe por mostrarme la vida de una manera diferente con esperanza, gracias.*

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1. Diabetes .....	2
1.1 Definición según WHO 1999 y ADA 2004 .....	3
2. Alteración de la tolerancia a la glucosa .....	5
3. Hipoglucemiantes orales .....	7
3.1 Sulfonilureas.....	9
4. Síndrome Metabólico .....	11
4.1 Resistencia a la insulina en el síndrome metabólico .....	13
5. El mecanismo del transporte de insulina.....	15
6. Modelos de medición de sensibilidad a la insulina .....	17
7. Técnica ELISA.....	19
8. Modelo n-STZ.....	21
9. Etnofarmacología .....	23
9.1 Plantas hipoglucemiantes.....	24
10. Antecedentes de plantas utilizadas .....	26
10.1 <i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol.....	26
10.2 <i>Mosannonna depressa</i> (Baill) Chatrou .....	28
11. Hipótesis.....	31
12. Objetivos .....	32
13. Metodología.....	33
13.1 Colecta de material .....	33
13.1.1 Preparación de extractos.....	33
13.2. Método farmacológico .....	34
13.2.1 Animales experimentales .....	34

13.2.2 Grupos Experimentales .....	34
13.2.3 Inducción de Diabetes .....	35
13.3 Diseño Experimental.....	35
13.3.1 Medición de glucosa.....	36
13.3.2 Medición de insulina .....	36
13.3.2.1 Obtención de plasma.....	36
13.4 Dosis hipoglucemiantes orales .....	36
13.5 Dosis Plantas hipoglucemiantes.....	37
13.6 Análisis estadístico .....	37
14. Resultados .....	38
15. Discusión.....	45
16. Conclusión.....	48
17. Bibliografía .....	49
18. Apéndice .....	55

## RESUMEN

La Diabetes mellitus tipo 2 es un problema de salud pública mundial que anualmente cobra muchas vidas; tan sólo en Estados Unidos 7% de su población es diabética y en el año 2005 se registraron 1 millón de casos nuevos (WHO, 2005).

En nuestro país esta patología es muy frecuente en personas entre 20 y 70 años; 8% son diabéticas y en total representan 4 millones, aunado a esto 1 millón desconoce que padece diabetes (SSA, 2006).

Por los daños que esta enfermedad crónico degenerativa causa en la población en edad productiva, a nivel nacional e internacional se han implementado mecanismos de prevención y tratamiento de este padecimiento para contrarrestarlo.

En México, el deterioro de los pacientes diabéticos es uno de los principales problemas de salud y se estima que esto irá en aumento en los próximos años. Si bien un gran número de personas se trata con hipoglucemiantes orales, otro gran número de pacientes, principalmente en el ámbito rural, se trata con plantas medicinales, por lo que queda claro la importancia de estudiar de una manera científica los posibles efectos de estas plantas.

En este trabajo se evaluó el efecto de dos plantas hipoglucemiantes: *Cecropia obtusifolia* Bertol y *Mosannonna depressa*, sobre la secreción de insulina en ratas (n-STZ) diabéticas.

Se probaron los extractos butanólicos de *Cecropia obtusifolia* Bertol y *Mosannonna depressa* (Baill) Chatrou, dos plantas utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en el sureste de México. Estas muestran un efecto similar al control positivo del fármaco tolbutamida, capaz de estimular la célula beta del páncreas a secretar insulina. El efecto que muestran estas plantas sobre la secreción de insulina, se vio acentuado al comparar las curvas de glucosa contra las de insulina con valores de glucosa correspondientes a sus curvas de insulina.



## 1. DIABETES

En 1985 se estimó que 30 millones de personas alrededor del mundo tenían diabetes tipo 2. Para 1995 esta cifra se disparó a 135 millones. La Organización Mundial de la Salud estimó que el número de personas con diabetes alrededor del mundo en el año 2000 fue de 177 millones; para el año 2030, el organismo predice que existirán 370 millones de adultos diabéticos en el mundo. Esto implica un incremento del 120% en el número de casos. También para esa fecha, la edad promedio de las personas diabéticas en los países desarrollados será de 65 años; mientras que, para los países en vías de desarrollo como México será de 45 a 64 años de edad, esto es, la etapa más productiva de la vida. En México, el número de pacientes se incrementará de 2, 178,507 a 6, 130,209, es decir, el 182 % en el mismo periodo pasando a ocupar el quinto puesto en el mundo (WHO, 2005).

En el último informe de gobierno de los Estados Unidos Mexicanos (2006), se declaró que la diabetes es la primer causa de muerte en el país, ya que en 1985 se registraron 20 918 muertes y para el 2006 se registraron hasta septiembre 65 500, lo que refleja la presencia de un aumento aproximado del 300% en tan solo 20 años (SSA, 2006).

En México, la Secretaria de Salud informó que la diabetes mellitus es la primera causa de muerte en el país (SSA, 2006), con una tasa de mortalidad general de 1/48.96.

La diabetes está asociada a un aumento del riesgo de sufrir una cantidad de complicaciones serias, muchas veces graves, y algunas poblaciones están expuestas a un riesgo aún mayor (ADA, 2004).

Un mal nivel de glucemia en la sangre conduce a las siguientes enfermedades:

- Microangiopatía

- Polineuropatía
- Síndrome del pie diabético
- Retinopatía
- Nefropatía
- Adipohepatía
- Macroangiopatía
- Coma diabético

## 1.1 Definición de diabetes según la WHO (1999) y ADA (2004)

La diabetes mellitus describe un desorden metabólico de múltiple etiología caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, debidos a los defectos en la secreción o acción de la insulina.

Existen dos tipos principales de Diabetes:

**Diabetes Tipo 1:** En la cual el páncreas falla en la producción de insulina, lo cual es esencial para sobrevivir. Esto se debe a una destrucción completa de las células  $\beta$  con ausencia total de insulina. Sin embargo, en raras ocasiones una diabetes mellitus mucho más leve puede deberse a anomalías genéticas determinadas de la síntesis y secreción de insulina. Este tipo de diabetes se desarrolla principalmente en niños y adolescentes, pero se ha notado un incremento en etapas de la vida más avanzadas.

**Diabetes Tipo 2:** La cual resulta de la incapacidad del cuerpo para responder propiamente a la acción de la insulina producida por el páncreas. Un factor importante en este tipo de diabetes es el trastorno leve o precoz del patrón de secreción de la insulina. Se caracteriza por cambios de la secreción cíclica, disminución de la frecuencia de los pulsos y retraso de la respuesta ante la elevación de la cantidad de glucosa. Finalmente deja de reconocerse su capacidad de estimulación. La causa primaria del trastorno de la célula  $\beta$  aún no se conoce. La diabetes tipo 2 es mucho más común y cuenta con alrededor del 90% de todos los casos de diabetes en el mundo. Esta ocurre más frecuentemente en adultos, pero se ha observado un incremento en adolescentes también.

**Diabetes Gestacional.** Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa reconocida por vez primera durante el embarazo. Generalmente después de aproximadamente seis semanas posparto las mujeres vuelven a valores normales en su control glucémico.

Otros tipos de diabetes se presentan en menos del 5% de todos los casos diagnosticados, entre ellos se encuentran el defecto genético en las células

beta, resistencia a la insulina determinada genéticamente, enfermedades del páncreas causadas por defectos hormonales, por compuestos químicos o fármacos (WHO, 1999).

Por tanto es indispensable desarrollar estudios alrededor de esta enfermedad y sus complicaciones, ya que se estima que cada año mueren cerca de 4 millones de personas a causa de diabetes; generalmente estas muertes son asociadas a sus complicaciones cardiovasculares. Además, un gran número de pacientes diabéticos no es capaz de seguir trabajando lo cual es una causa de la pérdida de la productividad (WHO, 2005).

## 2. ALTERACION DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA

Todos estos datos nos obligan a pensar en el impacto sanitario que determina esta enfermedad y a jerarquizar la importancia de su prevención y diagnóstico temprano.

Para ello es de gran interés la identificación de las personas con alto riesgo de desarrollar diabetes. En este sentido, los nuevos criterios diagnósticos de Diabetes propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y por un comité asesor de la OMS (Organización Mundial de la Salud), han facilitado la detección temprana de los trastornos en la tolerancia a los hidratos de carbono, ya que la mayor revisión involucra la disminución de los valores de glucemia de ayuno para el diagnóstico de diabetes, de 140 mg/dl a 126 mg/dl (7.8 mmol/lit a 7 mmol/lit).

Los términos IFG (Impaired Fasting Glucose) e IGT (Impaired Glucose Tolerance), se refieren a estadios metabólicos intermedios entre la homeostasis normal de la glucosa y la DM (Diabetes Mellitus). Son estadios previos al desarrollo de la diabetes. No son entidades clínicas propiamente dichas, pero su importancia radica en que se ha demostrado que constituyen factores de riesgo para el desarrollo de DM o una enfermedad cardiovascular (WHO, 1999).

La prevalencia de la IFG, IGT y diabetes, ha sido ampliamente estudiada en una población adulta de los EEUU, a través del NANHES III (Third National Health and Nutrition Survey). La prevalencia de diabetes fue estimada en 5.1% para adultos  $\geq$  de 20 años de acuerdo a los viejos criterios de la OMS (1985). Usando los criterios de la ADA (1997), los datos del NANHES III indican que la diabetes afecta a 7.8% de los adultos  $\geq$  de 20 años; o sea que, la prevalencia de diabetes no diagnosticada es de 2.7%. IFG fue encontrada en 6.9%  $\geq$  de 20 años e IGT en 15.6% de adultos entre 40 y 74 años (Harris M. et al, 1998).

Quizás los porcentajes no reflejan la importancia de estos hallazgos, pero si pensamos en la alta prevalencia de diabetes en el mundo, estos porcentajes implican el diagnóstico de nuevos diabéticos y de la alteración en la tolerancia

a la glucosa en millones de personas en el mundo, que podría ayudar a prevenir la diabetes en personas que presentan estos desordenes metabólicos (ADA 2004). Por otro lado, el tratamiento principal no farmacológico es el ejercicio y la dieta.

### 3. HIPOGLUCEMIANTES ORALES

Alrededor del 40% de las personas que sufren diabetes requieren de hipoglucemiantes orales para el control de la glucosa en la sangre, cerca de 40% necesita insulina (WHO, 2006).

Las modificaciones en la dieta y el ejercicio son la primera línea de tratamiento para los diabéticos tipo 2. Las dietas bajas en calorías para inducir pérdida de peso resultan en un decremento de la glucosa en plasma, en algunos casos normalizando los niveles de glucosa sanguíneos. El mecanismo para mejorar la homeostasis de la glucosa seguido de la pérdida de peso, provoca la disminución de la insulina circulante ( Moorodian A., 1996).

La pérdida de peso y el ejercicio provocan una mejor respuesta a la insulina y la utilización de glucosa y mejoran los perfiles lipídico y lipoprotéico. Cuando estos métodos fallan en controlar adecuadamente los niveles de glucosa en sangre, entonces se prescriben hipoglucemiantes orales (Moller ,2001).

Entre los hipoglucemiantes orales (Tabla 1) se encuentran las sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, tiazolidinedionas e inhibidores de las alfa-glucosidasas, los cuales se encargan de controlar las principales causas de la hiperglucemia, como son la deficiencia en la producción de insulina, la producción de glucosa hepática, la resistencia periférica a la insulina y la absorción de glucosa a nivel intestinal, respectivamente. Cuando no es suficiente el tratamiento con los agentes orales se administra insulina.

## AGENTES HIPOGLUCEMIANTES ACTUALES PARA LA DIABETES TIPO 2

CLASE DE DROGA	BLANCO MOLECULAR	SITIO ACCION	DE EFECTOS SECUNDARIOS
INSULINA	Receptor de insulina	Hígado, músculo, tejido adiposo	Hipoglicemia y aumento de peso
SULFONILUREAS (glibenclamida, tolbutamida))	Receptor SU	Células $\beta$ pancreáticas	Hipoglicemia y aumento de peso
NATEGLINIDA REPAGLINIDA	Canal de K <sup>+</sup> dependiente de ATP		
BIGUANIDAS (metformina)	Desconocido	Hígado (músculo)	Disturbios gastrointestinales Acidosis láctica
Inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasas (acarbose)	$\alpha$ -glucosidasas	Intestino	Disturbios gastrointestinales
Thiazolidinedionas (Pioglitazona, Rostiglazona)	PPAR $\gamma$	Tejido adiposo, músculo. hígado	Aumento de peso, edema, anemia

*Tabla 1 tomada de Moller, 2001.*



### 3.1 SULFONILUREAS

Las Sulfonilureas son de los agentes hipoglucemiantes orales más utilizados, entre ellos se encuentra la Glibenclamida y la Tolbutamida (Figura 2), los cuales son secretagogos de insulina.

Las sulfonilureas son sustancias capaces de estimular a la célula beta del páncreas a secretar insulina (Fig. 1), efecto que es más acentuado en presencia de glucosa.

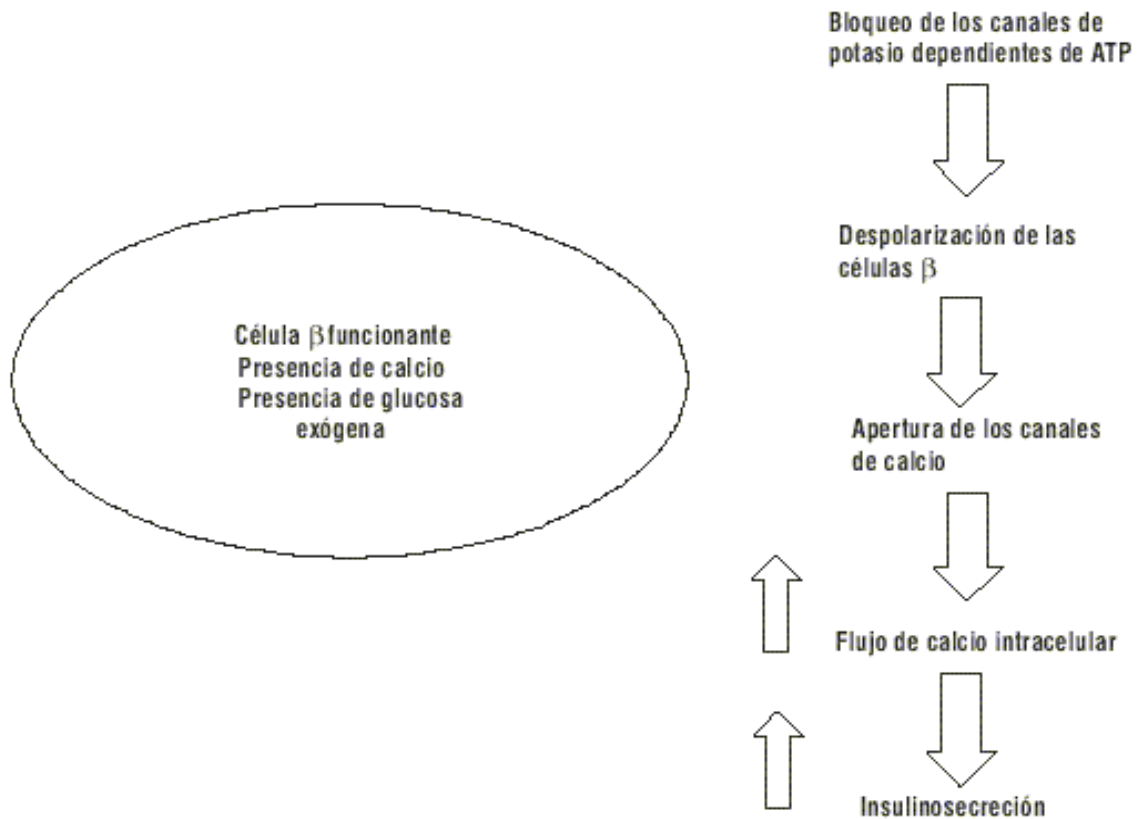


Fig. 1 Mecanismo de acción de las sulfonilureas (Doyle M. et al, 2003).

La molécula de sulfonilurea bloquea un canal de salida de potasio en la célula beta, el cual normalmente se cierra por influencia del ATP. Dicha acción conduce a un aumento del calcio libre intracelular que, estimula la secreción de insulina a partir de las células  $\beta$ . Así mismo, las sulfonilureas inhiben el

metabolismo hepático de la insulina, permitiendo, una mayor biodisponibilidad de la hormona. Aunque diversos estudios han mostrado que por efecto de tales fármacos se puede mejorar la sensibilidad de los órganos blanco a la insulina, el significado clínico de esta observación no es claro. Por lo general la efectividad de las sulfonilureas depende de la presencia de una reserva funcional de las células beta (Doyle, M., 2003).

Se ha estimado que 20% de los pacientes tratados con sulfonilureas muestran una pobre respuesta inicial al tratamiento, lo que se conoce como “falta primaria”, y obliga a considerar la adición de un segundo fármaco o a utilizar otra estrategia terapéutica (Moorodian A., 1996).

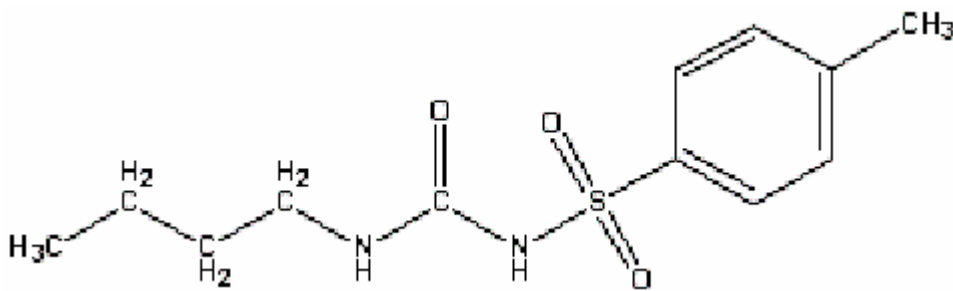


Figura 2. Molécula de Tolbutamida (ntp.niehs.nih.gov)

#### 4. SINDROME METABOLICO (SM)

En la fisiopatología del síndrome metabólico (SM) se imbrican alteraciones en el metabolismo glucolipídico, estados proinflamatorios y protrombóticos.

El vínculo entre todas ellas se atribuye a la resistencia insulínica (RI), favorecida por el aumento de ácidos grasos libres, muchas veces relacionado con el sobrepeso. Este estado provoca trastornos en la utilización de glucosa celular, así como desregulación de su producción hepática ( Han T. S. et al, 2006).

El metabolismo lipídico presenta también las consecuencias de la RI (Resistencia a la Insulina), que desembocan en las alteraciones características del SM: hipertrigliceridemia e hipocolesterolemia HDL.

La hipertensión se relaciona con diferentes mecanismos como consecuencia de alteraciones en la vía de la insulina y en la regulación del sistema nervioso.

En 1998 la OMS considero que una persona presenta síndrome metabólico si cumple con 2 o más de los siguientes criterios:

CARACTERÍSTICA	CRITERIO
Circunferencia Abdominal	
Hombre	>120cm
Mujer	>88 cm
c- HDL en ayuno	
Hombre	<40 mg/dL
Mujer	< 50 mg/dL
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL
Glucosa en sangre	≥ 110 mg/dL
Presión sanguínea	≥ 130/85 mmHg

Tabla 2: Adult Treatment Panel III (ATP III 2001).

En la actualidad se acepta el denominador común de la resistencia a la insulina (RI), para la mayoría de los casos de síndrome metabólico y diabetes mellitus.

En el desarrollo del síndrome metabólico hay factores predisponentes (Fig. 3) que se ven potenciados por factores adquiridos, como el exceso de grasa corporal y la escasez de actividad física (Bajaj M., et al 2003).

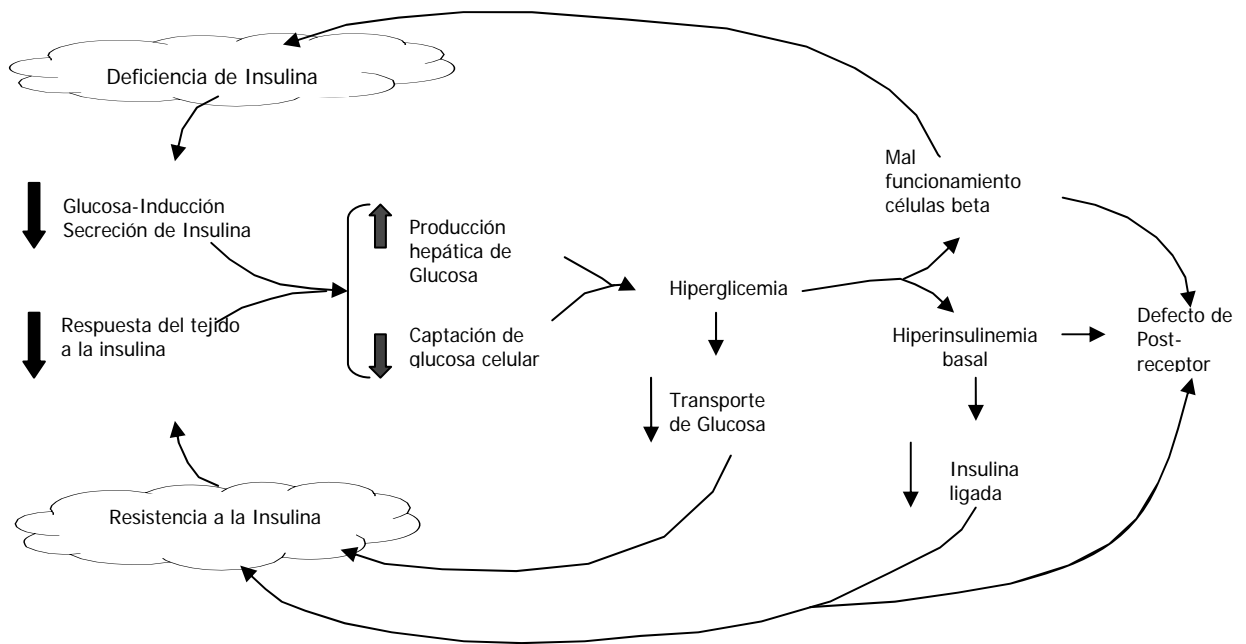


Fig. 3: Secuencia patogénica de eventos ligados al desarrollo de la diabetes tipo2. Fuente: Bajaj M., et al, 2003.

#### **4.1 RESISTENCIA A LA INSULINA EN EL SÍNDROME METABÓLICO**

Se ha considerado como hipótesis fisiopatológica subyacente al SM la RI. Esta se define como un defecto en la acción de la insulina que provoca aumento de la insulina basal para mantener la glucemia en un rango normal.

El principal contribuyente al desarrollo de RI es el exceso de ácidos grasos libres (AGL) circulantes, que se derivan bien de las reservas de triglicéridos (TG) del tejido adiposo sometidos a la lipasa dependiente de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) o bien de la lipólisis de lipoproteínas ricas en TG en los tejidos por la lipoproteinlipasa (Petersen Falk, et al 2006).

Al desarrollarse la RI, aumenta la liberación de AGL en el tejido adiposo que, a su vez, inhiben los efectos antilipolíticos en la insulina.

Por otro lado, los AGL suponen un exceso de sustrato para los tejidos sensibles a la insulina y provocan alteraciones del sistema de señales que regulan el metabolismo de la glucosa. En el músculo modifican la acción de las proteincinasas. En el hígado, en experimentación animal se ha comprobado que provocan defectos en los receptores estimulados por insulina. Los AGL aumentan la producción hepática de glucosa y disminuyen en los tejidos periféricos la inhibición de la utilización de glucosa mediada por insulina. Mientras tanto, continúa la génesis de lipoproteínas hepáticas, relacionada con el efecto estimulante de dichos AGL y de la insulina (Bajaj M., et al, 2003).

En el músculo, en pacientes resistentes a la insulina, obesos y con diabetes mellitus (DM) tipo 2, se han encontrado defectos intracelulares en la fosforilación oxidativa de las mitocondrias que se relacionan con la ocupación de las vías metabólicas por los lípidos, llegando incluso a su acumulación en forma de TG.

Se considera que el almacenamiento disfuncional de energía del obeso es el punto clave para el desarrollo del SM. Según esta teoría, la RI es consecuencia de alteraciones en el procesado y almacenamiento de ácidos grasos y triglicéridos (TG) (moléculas básicas de reserva energética).

La tendencia fisiológica es el almacén de TG en adipocitos pequeños periféricos, pero cuando la capacidad de estas células se sobrepasa, se acumulan en el músculo y causan RI a la insulina de dichos tejidos (Miranda et al, 2005).

El aumento del tejido adiposo intraabdominal o visceral provoca un aumento del flujo de AGL hacia la circulación esplácnica, mientras que los derivados del tejido subcutáneo evitan el paso hepático y sus consecuencias (aumento de la producción de glucosa, síntesis de lípidos y secreción de proteínas protrombóticas).

También se ha comprobado que el depósito patológico puede realizarse en adipocitos periféricos anormalmente grandes, como se demuestra en un estudio realizado en indios pima. El efecto del tamaño del adipocito en el riesgo del desarrollo de DM parece ser independiente y aditivo al efecto de la insulino-resistencia (Laclaustra et al, 2006).

Los síndromes lipodistróficos constituyen un buen ejemplo de las consecuencias de la incapacidad de almacén del exceso de TG en los depósitos fisiológicos. Como consecuencia, en estos individuos se producen hipertrigliceridemias severas, hígado graso y DM (Ídem).

## 5. MECANISMO DEL TRANSPORTE DE INSULINA

Hoy sabemos que la acción metabólica primaria de la insulina es facilitar la disposición postprandial de glucosa, vía sus acciones en tres órganos blanco: supresión de la producción de glucosa por el hígado, estimulación del metabolismo de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo. Los defectos en la secreción de insulina y en la acción de la insulina sobre sus tejidos blanco, se manifiestan clínicamente como diabetes.

El descubrimiento de la insulina por Banting y sus colegas a comienzos de la década de los 20's, se considera como uno de los logros científicos más grandes del siglo XX. Al igual que otros descubrimientos, este tiene aún implicaciones muy profundas. A pesar de los avances que se han alcanzado hasta el momento con respecto a esta molécula, hay mucho por descubrir sobre como es que lleva a cabo sus efectos. Más de 80 años han pasado desde el descubrimiento de la insulina y los eventos moleculares apenas se han comenzado a elucidar desde hace 20 años con la clonación del receptor de insulina, los avances de la biotecnología y el desarrollo de anticuerpos específicos a fosfotirosina (Ross S., et al, 2004).

Un efecto metabólico primario de la insulina es estimular la utilización de glucosa circulante en el músculo y el tejido adiposo. Bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas, se piensa que el transporte de glucosa tiene un límite en cuanto a la utilización y al metabolismo en el músculo esquelético y tejido adiposo.

Por lo tanto, la regulación del transporte de glucosa por la insulina es un factor crítico en la homeostasis de la glucosa (Barg S., 2003).

Conceptualmente, el transporte de glucosa mediado por insulina puede ocurrir ya sea por estimulación de la actividad de proteínas de transporte que se encuentran en la superficie de células o por translocación de un transportador intracelular a la superficie celular en respuesta a la insulina (Fig. 4). Se sabe ahora que la utilización de glucosa mediada por insulina es mediada a través

de un transportador isotipo 4 (Glut 4), tanto en músculo como en tejido adiposo. El transportador Glut 4 es único por su biología de translocación a la membrana plasmática en respuesta a insulina o contracción muscular. Este proceso es defectuoso en la diabetes mellitus, sin importar el tipo. En cualquiera de los casos, la translocación de Glut 4 hacia la superficie celular de músculo y tejido adiposo estimulada por la insulina es atenuada. Por lo tanto, como primer paso para la identificación de puntos de intervención terapéutica, hay un enfoque en identificar y caracterizar la maquinaria molecular de señalización de insulina con el objetivo último de identificar una terapéutica racional (Ross S. et al, 2004).

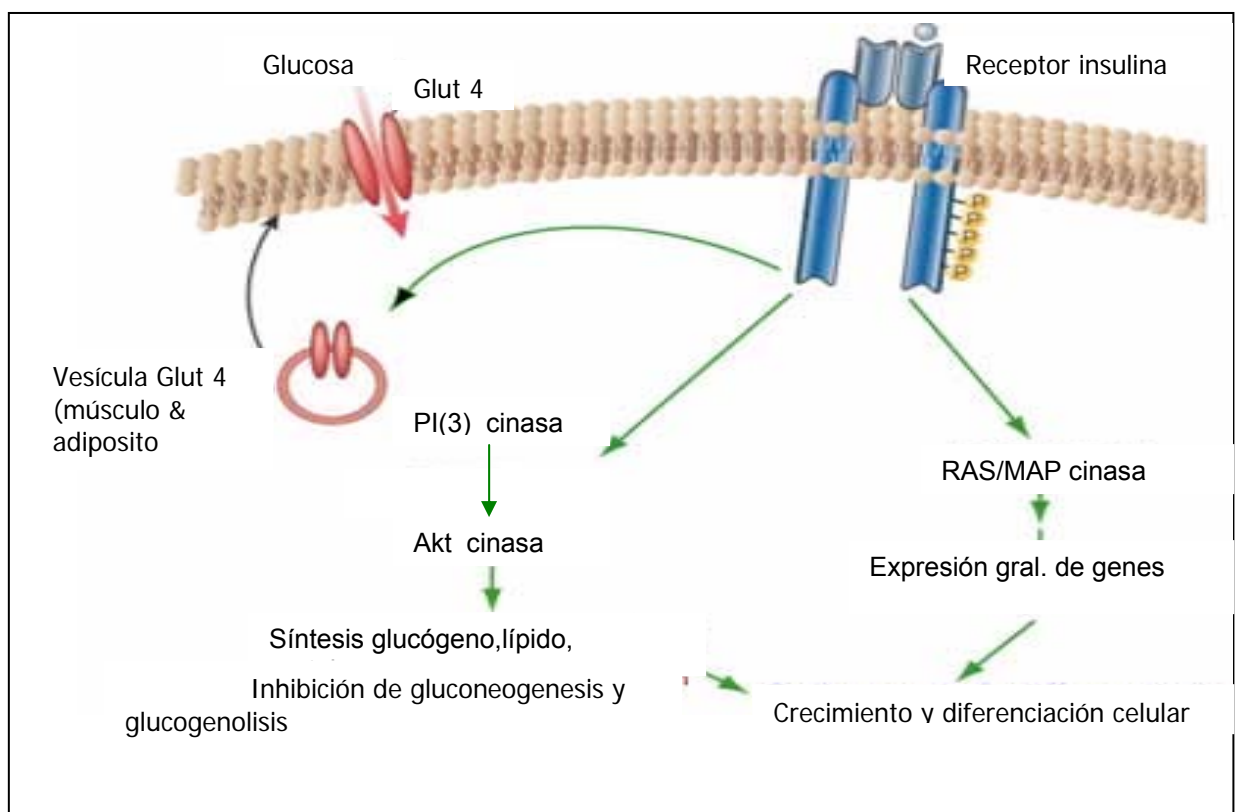


Figura 4. Mecanismo del transporte de la insulina (Najjar S., 2001).



## 6. MODELOS DE MEDICIÓN DE SENSIBILIDAD A LA INSULINA.

Existen varios procedimientos desarrollados para la medición de sensibilidad a la insulina: clamp euglicémico, prueba de tolerancia a la glucosa endovenosa o modelo mínimo, prueba de supresión de la insulina y prueba de tolerancia a la insulina.

- Clamp euglicémico: La metodología del clamp fue inicialmente ideada por Andres, R. y colaboradores (1966), por analogía con el clamp de voltaje utilizado en neurociencias. Básicamente se inyectan, por vía endovenosa, una dosis de insulina fija y una infusión variable de glucosa suficiente para lograr valores sanguíneos normales durante la prueba. El clamp tiene algunas desventajas, es una técnica altamente invasiva, los efectos hipoglucémicos se mantienen por más tiempo aunque la insulina recupere su nivel basal.
- Modelo mínimo: se inyecta glucosa al 50%, por vía endovenosa, esto es seguido de frecuentes muestreos de glucosa e insulina durante 240 minutos. Con estos datos, se derivan mediante dos ecuaciones diferentes los índices de sensibilidad a la insulina (SI) y efectividad de la glucosa (Sg). Índices debajo de  $2 \times 10^4$  uU/mLx min. ocurren en presencia de severa resistencia insulínica; mientras que valores sobre  $5 \times 10^4$  uU/mLx min. son observados en sujetos normales (Saad M. et al, 1994).
- Prueba de supresión a la insulina: fue descrita por primera vez por Shen (1970), en su versión original contemplaba una infusión cuádruple de glucosa, insulina, propanolol y epinefrina. Experimentalmente se induce hiperglucemia, lo que estimula la producción endógena de insulina, que es inhibida por la adrenalina, y dado que ésta estimula la producción endógena de glucosa, se administra propanolol para bloquearla. Posteriormente la prueba fue modificada reemplazando la adrenalina y el propanolol por somatostatina (Harano Y. et al, 1977), que suprime la secreción endógena de insulina, glucagon y hormona del crecimiento, inhibe la gluconeogénesis en individuos normales como en

diabéticos y no tiene efectos directos sobre la glucosa ni sobre el metabolismo de lípidos.

- Prueba de tolerancia a la insulina: fue el primer método desarrollado (Reaven G.M. et al, 1983) para evaluar la sensibilidad de la insulina *in vivo*, y consiste en aplicar, por vía intravenosa una dosis farmacológica de insulina (0.1 U/Kg), recolectar muestras de sangre para medir glucosa e insulina a los 15 y 5 minutos previos a la insulina, y a los 3, 6, 9, 12, 15, 20, y 30 minutos después de la infusión.

Por otro lado, existen varios modelos *in Vitro* que han sido desarrollados para el estudio de la secreción pancreática de insulina. Estos incluyen la perfusión del páncreas, aislar los islotes de Langerhans, purificar las células  $\beta$  y obtener líneas celulares secretoras de insulina. La concentración de insulina es medida por radio inmunoensayo (usando  $^{125}\text{I}$  –marcador de insulina) o ELISA (enzyme linked immunoassay).

El páncreas perfundido, los islotes aislados y las células  $\beta$  purificadas son preparados en fresco después de sacrificar al animal (usualmente ratas o ratones). Aislar los islotes de Langerhans conlleva a la digestión en colagenasa y la purificación de tejidos exocrinos. (Soumyanath 2006)

Las técnicas para purificar células  $\beta$  primarias son igualmente complicadas y requieren técnicas especiales tales como la activación fluorescente de células para clasificar las diferencias entre las células  $\beta$  y otras células de los islotes de Langerhans. En suma, las células  $\beta$  primarias no proliferan en cultivo y es difícil mantenerlas por un periodo largo de tiempo. Estos factores limitan el uso de los islotes aislados y de las células  $\beta$  primarias si se requieren hacer varios experimentos.

Por otro lado, se han desarrollado líneas celulares secretoras de insulina. Estas líneas celulares son transformadas usando diferentes técnicas tales como la radiación, la transformación viral y la biotecnología. La ventaja de las líneas celulares es que se pueden mantener mucho más tiempo y ser empleadas en varios experimentos. En comparación con los islotes de Langerhans aislados, se minimiza el número de animales utilizados en los experimentos. Sin

embargo, como las células  $\beta$  son transformadas, pierden algunas características (Ídem.).

## 7. TÉCNICA ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*)

Se ha utilizado la técnica ELISA para la medición de la insulina en ratas con diabetes inducida, ya que es un método eficaz, además de presentar mayor sensibilidad a la insulina, que los radio inmunoensayos; por lo tanto, las muestras son más reducidas en volumen, permitiéndonos obtener varias repeticiones de la misma.

Esta técnica se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente (Lehninger, 2000).

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisa la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, entre otras muchas aplicaciones.

La técnica Elisa desarrolla cuatro fases principales en la mayoría de las pruebas. Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

- *Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima* (peroxidasa, fosfatasa alcalina). El anticuerpo conjugado al enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competencia de antígenos.
- *Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos*. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
- *Formación de una o más capas de inmunocomplejos*. En el caso del antígeno unido a la placa, se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más

anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa, se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.

➤ *Revelado de la reacción enzimática.* Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría (Technical guide for ELISA [www.kpl.com](http://www.kpl.com)).

Actualmente se conocen tres métodos principales de la técnica ELISA que son: directo, indirecto y sandwich. En este trabajo utilizamos el método de sandwich, ya que presenta una especificidad y sensibilidad mejores que los otros métodos, y así nos permitió cuantificar la insulina en ratas diabéticas n-STZ, que presentan una deficiencia a la secreción de insulina basal.

- ELISA sandwich (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (Technical guide for ELISA [www.kpl.com](http://www.kpl.com)).

## 8. MODELO n-STZ

La estreptozotocina es una molécula de 2-deoximetilnitroglicopiranososa que produce un efecto tóxico selectivo en las células  $\beta$  e induce diabetes mellitus en animales de laboratorio.

Aunque el mecanismo exacto de su toxicidad todavía está en discusión, una propuesta del sitio de acción de la estreptozotocina (STZ) es el DNA nuclear por radicales libres que atacan al núcleo de las células  $\beta$ . Durante la descomposición de la estreptozotocina se forman iones carbonio altamente reactivos, lo cual causa una alquilación de las bases del DNA (LeDoux, et al, 1986). La STZ es responsable de un decremento en la disponibilidad de NAD, lo que interrumpe los procesos enzimáticos de las células  $\beta$  y provoca su muerte (Okamoto, 1981).

Las ratas neonatas tratadas con estreptozotocina al nacer (n0-STZ), muestran una diabetes aguda con deficiencia de insulina después de 3-5 días de nacidas. Esto fue confirmado según los siguientes criterios: la glucosa en plasma es alta ( $345 \pm 37$  mg/dl), la insulina pancreática muestra un decremento del 93%; la insulina en plasma es baja considerando los altos niveles de glucosa, el glucagon en plasma es alto a pesar de no haber cambio en el contenido de glucagon pancreático. Las crías sobrevivientes fueron mantenidas fácilmente y en total hubo una mortalidad menor al 30%.

La marcada hiperglucemia observada en ratas neonatas tratadas con estreptozotocina es sólo pasajera. Esto puede explicar porque algunos autores reportaron que las ratas neonatas fueron resistentes a la estreptozotocina. Al final de la primera semana, la glucosa en plasma y los valores de insulina no fueron significativamente diferentes a los controles.

Después de tres a cuatro semanas de edad, el peso corporal y los valores de glucosa basal en plasma en las ratas n0-STZ no se distinguen de los valores en ratas control. Sin embargo, después de ocho semanas de edad las ratas n0-STZ muestran una ligera hiperglucemia (150- 180 mg/dl), una respuesta anormal a las pruebas de tolerancia a glucosa y un 50% de decremento en la

insulina pancreática y sin ningún cambio en el glucagón almacenado en páncreas (Portha, et al., 1979).

Una interesante variante de este modelo ha sido reportada por Bonner-Weir and Weir (Bonner-Weir, et al, 1981; Weir et al, 1981). Ratas Sprague Dawley inyectadas al segundo día de nacidas con 90 mg/kg de estreptozotocina (n2-STZ). Para las seis semanas de edad estos animales muestran una hiperglucemia basal mayor a 200mg/dl y una tolerancia anormal a la glucosa, y una ligera hipoinsulinemia.

En vista de esta heterogeneidad en el modelo, se compararon ratas Wistar hechas diabéticas con una inyección de estreptozotocina al segundo y al quinto día después de nacer. Como consecuencia de esto se obtuvieron tres modelos de diabetes no insulino dependientes (Ídem).

La versión n2-STZ muestra algunas características, las cuales son muy similares con las obtenidas en la versión n0-STZ, dado que mostraron una hiperglucemia basal con intolerancia a la glucosa, un aumento en la hemoglobina glucosilada, una fuerte reducción en la insulina pancreática, un decremento del 50% en la insulina en plasma y una falta de insulina cuando se somete a la exposición *in vivo* de glucosa.

El desarrollo y progresión de la hiperglucemia en la versión Wistar n5-STZ demostró muchas similitudes descritas por otros autores, usando el procedimiento descrito por Bonner-Weir, et al, administrando 90 mg/kg de STZ (Ibidem).

Las ratas n-STZ adultas se caracterizan por la baja liberación de insulina en respuesta a glucosa (Portha et al, 1979), porque el número de células  $\beta$  (almacenes de insulina en el páncreas) de estas ratas diabéticas es baja. La secreción defectuosa de insulina observada *in vivo* puede ser atribuida a estas anomalías cuantitativas de los islotes de Langerhans. Además, se encuentran las alteraciones de las células  $\beta$  responsables de la mediación del estímulo y la variación de acuerdo a la naturaleza del estímulo. Al presentar estas características el modelo n-STZ es una opción viable para observar la

deficiente secreción de insulina, y de esta manera probar fármacos que inducen un estímulo sobre la secreción de insulina (Ibidem).





## 9. ETNOFARMACOLOGÍA

Holmstedt y Brunh (1983) definieron a la Etnofarmacología como “La exploración interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados u observados por el hombre”. Sin embargo, la definición que se acepta en nuestros días fue propuesta por Schultes (1991), quien la define como: “La observación, identificación, descripción e investigación experimental de los efectos de las drogas utilizadas en la medicina tradicional”.

La Etnofarmacología tiene como objetivo principal el rescatar y documentar la herencia cultural antes de que ésta se pierda, así como investigar y evaluar los agentes empleados.

La Etnofarmacología es una ciencia interdisciplinaria, ya que abarca las observaciones en campo, así como también la descripción del uso y preparación de los remedios, la determinación botánica del material obtenido, también engloba los estudios fitoquímicos que son muy importantes para aislar los compuestos presentes en las plantas, así como los estudios farmacológicos.

Esta ciencia ha tomado una gran relevancia en los últimos años, ya que varias compañías farmacéuticas están interesadas en las plantas y su potencial para obtener agentes terapéuticos que ayuden al tratamiento de algunas enfermedades de gran prevalencia entre la población.

Esta ciencia, surgió mucho tiempo atrás de su propia definición. Los hombres de antiguas culturas utilizaban plantas, animales, hongos para curar enfermedades; estos conocimientos se transmitían oralmente de generación en generación. Tiempo después estos conocimientos se escribieron en libros especializados de Herbolaria y Medicina Tradicional.

El papel de la Etnofarmacología es muy importante en las sociedades actuales ya que se busca reintroducir los conocimientos ancestrales de plantas y otras especies utilizadas en la medicina tradicional, con una validación científica para

garantizar la utilización correcta y específica de los remedios utilizados en culturas antiguas y comunidades indígenas actuales.

## 9.1 PLANTAS HIPOGLUCEMIANTES

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal recurso del cual disponían los curanderos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Soumyanath, 2006).

Los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos, ya que los principios activos se encuentran biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y por tanto sus efectos secundarios son limitados.

Actualmente se conocen numerosas especies con posible actividad hipoglucemiante, son utilizadas en países occidentales desde hace siglos, como la goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) y la alholva (*Trigonella foenum-graecum*); otras son menos conocidas y proceden de diferentes medicinas tradicionales, entre ellas se cuentan la china, la hindú y la mexicana (Ídem).

Para el caso de México, Andrade-Cetto, and Heinrich, en 2005 reportaron que al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias son usadas como agentes hipoglucemiantes. Entre las familias más mencionadas se encuentran: Asteraceae, Fabaceae, Cactaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae y Laminaceae. Se estima que esta cifra puede duplicarse, debido a todas las especies que no han sido documentadas.

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado a nivel nacional y mundial, y la gran cantidad de compuestos aislados de numerosas plantas

reportadas en la literatura, en la actualidad sólo se ha obtenido un derivado de plantas medicinales útil como hipoglucemiante: la metformina sintetizada de *Galega officinalis* (Andrade-Cetto, 1999).

Los estudios farmacológicos que se han realizado sobre plantas hipoglucemiantes van de lo más simple a lo más complejo, pero un problema que en general presentan es que en pocos se ha aislado el principio activo, en la mayoría de éstos sólo se comprueba si presenta una actividad hipoglucemiante o no.

Por tanto, es necesario realizar más estudios interdisciplinarios, haciendo uso de la fitoquímica, y así poder determinar el principio activo, tanto como la farmacología para poder encontrar si existe un efecto hipoglucemiante, de la fisiología, sistemática y de otras muchas disciplinas, y así poder encontrar un agente hipoglucemiante con mayor eficacia.

## 10. ANTECEDENTES DE LAS PLANTAS UTILIZADAS

Las plantas utilizadas en este estudio fueron seleccionadas por que han sido estudiadas previamente como agentes hipoglucemiantes en el manejo de la diabetes tipo 2. Y en este estudio se emplea un modelo farmacológico de ratas diabéticas que nos permite tener una percepción sobre la estimulación de la secreción de insulina de estas plantas.

### 10.1 *Cecropia obtusifolia* Bertol. (Cecropiaceae)

Nombres comunes: Hormiguillo, Guarumbo o Chancarro

#### *Descripción:*

Árbol monopódico de hasta 20 metros, con tronco derecho, hueco, con pequeños contrafuertes o raíces zancudas de sección circular, con copa irregular, estratificada y con pocas ramas horizontales al tronco. La corteza es de color gris claro; las hojas se encuentran dispuestas en espiral y aglomeradas en la punta de las ramas, son simples y peltadas, de color verde oscuro, brillante en el haz y grisáceas en el envés. Especie dioica con flores en espigas axilares sostenidas por una bráctea espatiforme caediza, las espigas masculinas son pardo grisáceas, 12-15 de 8-10 cm. de largo, espigas femeninas de 4-6 de 13-20 cm de largo. Los frutos son aquenios agregados en las espigas, que contienen una semilla de sabor similar al higo y maduran todo el año (Pennington y Sarukan, 1998).

#### *Distribución:*

Tiene una amplia distribución en el país, que va desde Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Tabasco y Chiapas en la vertiente del Golfo, y desde Sinaloa hasta Chiapas en el Pacífico. Propia de vegetación secundaria de cualquier tipo de selva, excepto en selva baja caducifolia y espinosa (Ídem).

#### *Antecedentes Etnobotánicos:*

Se recomienda para el tratamiento de diabetes, así como para problemas de presión arterial y problemas renales en general. También hay reportes de su uso para piquetes de alacrán, quemaduras, como analgésico para el asma, reuma, obesidad y nervios (Argueta, 1994). Este árbol tiene diversos nombres según la región: en Hidalgo y Oaxaca se le conoce como Hormiguillo, Guarumbo o Chancarro y es usada para el tratamiento de la diabetes, se emplea la infusión de las hojas tomada como agua de tiempo.

#### *Antecedentes fitoquímicos:*

Estudios fitoquímicos han detectado esteroides y taninos además de azúcares como: ramosa, glucosa y xilosa; también se han reportado la presencia de saponinas y fenoles (Trejo, 1983).

Andrade-Cetto y Wiedenfeld en 2001 reportan para el extracto butanólico la presencia de flavonoides, iso-orientina y ácido clorogénico, de los cuales se ha comprobado actividad hipoglucemiante; en el caso del ácido clorogénico exhibe un mecanismo de inhibición de la producción hepática de glucosa, y la isorientina actúa como antioxidante.

#### *Antecedentes farmacológicos:*

Trejo (1983) realizó estudios con ratones CD1 con diabetes inducida por aloxan en el que reporta actividad hipoglucemiante del extracto hexánico de la planta. Otro trabajo hecho con conejos hiperglucémicos demostró la acción hipoglucemiante del extracto acuoso de las hojas de la planta (Roman-Ramos, 1991).

Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001) demostraron que la iso-orientina y el ácido clorogénico presentes en el extracto examinado en este trabajo, son los responsables de la actividad hipoglucemiante en ratas con diabetes inducida (n-STZ).

Revilla *et. al* 2007. (en prensa) reporta la actividad hipoglucemiante de *Cecropia obtusifolia* Bertol probada en pacientes diabéticos.

## 10.2 *Mosannonna depressa* (Baill) Chatrou (ANNONACEAE)

Nombres comunes: elemuy ,yumel y Nazareno prieto.

### *Descripción:*

Arbusto o árbol, usualmente de 10 m. de altura o menos. Posee corteza gris clara, el tronco de 20 cm. o menos de diámetro, las ramas jóvenes son pilosas y se vuelven glabras rápidamente; las hojas jóvenes sobre los pecíolos miden de 3-4 mm. de longitud, lanceoladas a elípticas, la mayoría de 7 a 12 cm. de largo y de 2 a 5 cm. de ancho en etapas más avanzadas de desarrollo, agudas a atenuadas-acuminadas, usualmente agudas y desiguales en la base, lustrosas por encima, un poco pilosas en sus estados jóvenes pero conforme envejecen se vuelve glabras, nervaciones prominentes; inflorescencias terminales u opuestas a las hojas, pedicelos de 1 a 2 cm. de longitud, glabros o ligeramente cubiertos de tricomas; los sépalos de redondos a ovalados, obtusos, glabros, de 2 a 3 mm. de longitud; los pétalos totalmente ovalados o elípticos, glabros, verdosos, de 18 a 23 mm. de longitud; sus frutos son bayas de 1.5 cm. de longitud o mas pequeños, elipsoides, rojos, obtusos, glabros (Standley y Steyermark, 1946).

### *Distribución:*

Habita en clima cálido entre los 2 y los 34 msnm. Asociada a vegetación perturbada derivada de bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio (Argueta, 1994).

### *Antecedentes etnobotánicos:*

Los usos medicinales de esta planta se encuentran referidos en la zona sur del país, Quintana Roo y Yucatán, siendo empleada en problemas renales, entre ellos, mal de riñón, cálculos y como diurético. Otros padecimientos en los que se aplican sus propiedades medicinales son: diabetes, leucorrea y gonorrea (Argueta *et al.*, 1994; Andrade-Cetto and Martínez- Zurita *et al.*, 2005).

Andrade-Cetto et. al reportan para 2006 que en la comunidad maya de Chikindzonot en el estado de Yucatán, *M. depressa* es utilizada como agente hipoglucemiante para la diabetes tipo 2 y también es usada para problemas renales. El nombre con que es denominada esta planta es elemuy ,yumel y Nazareno prieto. Se utiliza la infusión de 15g. de la raíz en un litro de agua y es ingerida como agua de uso.

#### *Antecedentes fitoquímicos:*

De la corteza de *Mosannonna depressa* se han aislado los componentes fenólicos alfa-azarona y otros tres propenilbencenos; además de dos alcaloides parecidos en cuanto a estructura al alcaloide llamado ateroespermidina. Se ha observado que a dosis de 80 mg./kg. de alfa-azarona administrada en rata, se producen decrementos de colesterol y triglicéridos (Argueta, 1994). También del extracto clorofórmico (CHCl<sub>3</sub>) de la corteza de la parte aérea se han aislado los siguientes compuestos: 1,2,3,4 - tetrametoxi-5-(2-propenyl) benceno, 2,3,4,5- tetrametoxicinnamaldehido, trans-isomiristicina, 2,3,4,5-tetrametoxicinnamil alcohol y 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehido. Este último presentó actividad inhibitoria de crecimiento en plántulas de diferentes especies (Jiménez et. al., 1996).

Andrade-Cetto et. al. (2005) reporta dos derivados fenil-butano; **(1)** 2-Hidroxi-3, 4,5-trimetoxi-1-(2',4'-hidroxi-3'-dihidroxi)butil-benceno; **(2)** 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxi-1-(2',3',4'-hidroxi)butil-benceno, obtenidos del análisis del extracto butanólico de la raíz de *M. depressa*.

#### *Antecedentes farmacológicos:*

En el trabajo de Andrade-Cetto et. al (2005), se encontró actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos, así como del extracto etanólico y butanólico, en ratas con diabetes inducida.





## 10. HIPOTESIS

Ha 2: El extracto butanólico de *C. obtusifolia* Bertol presenta un efecto sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ).

H0 2: El extracto butanólico de *C. obtusifolia* Bertol no presenta un efecto sobre la secreción de insulina en ratas (n-STZ).

Ha 1: El extracto butanólico de *M. depressa* (Baill) Chatrou tiene un efecto sobre la secreción basal de insulina en ratas diabéticas (n-STZ).

H0 1: El extracto butanólico de *M. depressa* (Baill) Chatrou no tiene un efecto sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ).

## 11. OBJETIVOS

1. Evaluar el efecto del extracto butanólico de *Cecropia obtusifolia* Bertol sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n- STZ).
2. Evaluar el efecto del extracto butanólico de *Mosannonna depressa* (Baill) Chatrou sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ).

## 13. METODOLOGÍA

### 13.1 COLECTA DE MATERIAL.

Los extractos butanólicos de *Cecropia obtusifolia* Bertol y *Mosannonna depressa* (Baill) Chatrou, fueron anteriormente elaborados y estudiados por el Dr. Adolfo Andrade Cetto y se encuentran referidos en sus publicaciones de los años 2001, 2005. Las plantas cuentan con ejemplares de herbario depositados en el herbario del IMSS, bajo los números de vaucher siguientes: *Cecropia obtusifolia* Bertol IMSSM11496 y IMSSM14140; *Mosannonna depressa* (Baill) Chatrou IMSSM14702 y IMSSM14706.

#### 13.1.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Para el caso de *Cecropia obtusifolia* se tomaron 300g de planta molida, y para *M. depressa* se utilizaron 600 g de la raíz; se colocaron en un cartucho de papel filtro dentro de un soxhlet en hexano; se dejó extraer por 48 h. aproximadamente.

Una vez extraído el hexano, éste se tira; se deja secar el cartucho.

La siguiente extracción se hace con metanol por 48 horas, hasta que el color del solvente sea muy pálido; el metanol se evapora en el rotavapor a presión reducida; una vez evaporado totalmente se realiza una limpieza de clorofilas, para esto se le agrega la siguiente mezcla:

- Metanol 40%
- Agua 10%
- Tetracloruro de Carbono 50%

Se agita vigorosamente la mezcla en un embudo de separación, dejando escapar el gas, obteniendo después de un reposo de 10-15 min., dos fases:

- Fase superior Metanol- Agua

- Fase inferior      Tetracloruro de Carbono

Se evapora la fase superior hasta que quede solo Agua, ya evaporado se agrega una proporción 1:1 agua: butanol; se evapora la fase butanólica hasta obtener polvo; la cantidad final obtenida se pesa.

## 13.2 FARMACOLÓGICA

### 13.2.1 Animales Experimentales

Se utilizaron ratas Wistar machos neonatos de 5 días de nacidos (peso entre 10 y 12g) crías de hembras Wistar, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se mantuvieron bajo el cuidado de la madre hasta los 30 días de edad, después fueron destetados. Las ratas permanecieron en una sala a 25°C con 55% de humedad, en un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Las ratas tuvieron acceso ad limitum al alimento (Purina Ralston) y el agua durante todo el experimento.

### 13.2.2 Grupos experimentales.

Las ratas fueron separadas en 6 grupos experimentales de 5 ratas cada uno, conforme al tratamiento que recibían. Los tratamientos se muestran en la tabla 3:

<i>GRUPO</i>	<i>TRATAMIENTO</i>
Gpo. 1 Normal	Solución fisiológica
Gpo. 2 Normal + Tolbutamida	Tolbutamida 100mg/kg
Gpo. 3 Diabético	Solución fisiológica
Gpo. 4 Diabético + Tolbutamida	Tolbutamida 100mg/kg
Gpo. 5 Diabéticas + <i>M. depressa</i>	Extracto butanólico <i>Mosannonna depressa</i> (Baill) Chatrou 50mg/Kg
Gpo. 6 Diabéticas + <i>C. obtusifolia</i>	Extracto butanólico <i>Cecropia obtusifolia</i> Bertol 150mg/Kg

Tabla 3. Grupos experimentales por tratamiento

### 13.2.3 Inducción de Diabetes.

Las ratas neonatas fueron inyectadas al quinto día post-nacimiento, vía intraperitoneal con 90 mg/kg. de estreptozotocina (STZ), disuelta en 20mL de buffer de acetatos pH 4.5. Los animales que sobrevivieron a la inyección (33.3%) permanecieron con la madre hasta los 30 días de edad, posteriormente fueron destetados y colocados en cajas separadas; ahí permanecieron los siguientes 30 días hasta que fueron monitoreados sus niveles de glucosa plasmática a los 2 meses de edad.

Aquellas ratas que presentaron valores  $\geq 150$  mg/dL de glucosa plasmática después de 8 horas de ayuno fueron considerados diabéticos; valores  $\leq 149$  mg/dL de glucosa no se incluyeron en el experimento.

### 13.3 Diseño Experimental

El experimento se diseñó considerando el modo de secreción de insulina basal no estimulada la cual es pulsátil, con una periodicidad de 9-15 minutos. La pérdida de secreción pulsátil es una de las primeras señales de trastorno de células beta en pacientes con DM.

Lo anterior se tomó en cuenta al establecer los tiempos de extracción de sangre para poder obtener resultados al medir insulina, además de evaluar el efecto sobre la secreción de ésta por parte de *M. depressa* y *C. obtusifolia* contra el fármaco control Tolbutamida.

Una vez calculada la dosis para cada rata experimental de acuerdo al tratamiento, como se señala más adelante, los extractos y el fármaco control fueron disueltos en 1.5 mL de solución fisiológica (NaCl 9%)

La administración de los extractos y el fármaco control se hizo con la ayuda de una sonda gastroesofágica, que nos aseguró que éstos llegasen al tracto digestivo.

Las mediciones de glucosa e insulina se hicieron en los tiempos 0, 15 y 75 minutos, donde T0 indica la toma previa a la administración del tratamiento, y T15 y T75 son las tomas posteriores a la administración del tratamiento.

El método anteriormente descrito se estableció para determinar el nivel de glucosa e insulina en sangre, producto de los tratamientos sobre la secreción de insulina.

El fármaco control utilizado fue Tolbutamida (Rastinon 500mg, Aventis Pharma S.A. de C.V.), ya que es un secretagogo de insulina.

#### 13.3.1 Medición de Glucosa

La sangre se obtuvo de la vena caudal que no posee terminaciones nerviosas, para evitar dolor al animal.

Los aparatos utilizados para la medición de glucosa fueron distintos glucómetros, Accutrend GC (Roche) y ACCU-CHECK Sensor (Roche), con sus respectivas tiras reactivas.

### 13.3.2 Medición de Insulina

#### 13.3.2.1 Obtención de plasma

El plasma se obtuvo centrifugando la sangre, obtenida de la vena caudal, en una microcentrifuga 15 min. a 8000 rpm, obteniendo 30µL de plasma, este se congelo a -70°C para su posterior cuantificación con el Ultrasensitive Rat insulin ELISA kit de Cristal Chemical.

### 13.4 Dosis de Hipoglucemiantes Orales

El hipoglucemiante oral que se utilizó fue Tolbutamida, las dosis fueron establecidas de acuerdo a Ohta y colaboradores que proponen que la dosis de 100mg/kg.

Para efectos de este estudio resulto apropiado establecer dosis mayores a las establecidas para poder obtener un mayor efecto.

### 13.5 Dosis de Plantas Hipoglucemiantes

Las dosis de *M. depressa* (5mg /kg) y *C. obtusifolia* (15 mg/kg) fueron establecidas de acuerdo a lo reportado por Andrade-Cetto y colaboradores en las publicaciones de 2005 y 2001 respectivamente, para este trabajo fueron modificadas en una relación de 1:10 para aplicar una dosis similar a la de Tolbutamida.



### 13.6 Análisis estadístico

Se empleo una prueba de ANOVA. Los datos se consideraron significativos con una  $p \leq 0.05$ .

## 14. RESULTADOS

Los valores medios de glucosa sanguínea obtenidos con los diferentes tratamientos descritos en la metodología se muestran en la Tabla 4, y en la Gráfica 1 y 2 .

Grupo Exp./ Tiempo min	Media de glucosa [mg/dL] $\pm$ error estándar		
	0	15	75
Normal	82 $\pm$ 2	102 $\pm$ 9	89 $\pm$ 5
Normal + Tolbutamida 100mg/kg	82 $\pm$ 4	89 $\pm$ 5	50 $\pm$ 4 <sup>1a</sup>
Diabético	199 $\pm$ 14 <sup>1</sup>	265 $\pm$ 28 <sup>1</sup>	229 $\pm$ 25 <sup>1</sup>
Diabético +Tolbutamida 100mg/kg	201 $\pm$ 18	224 $\pm$ 17	148 $\pm$ 15 <sup>1a</sup>
Diabetico + <i>M. depressa</i> 50mg/kg	195 $\pm$ 6	201 $\pm$ 14 <sup>1</sup>	144 $\pm$ 8 <sup>1a</sup>
Diabetico + <i>C. obtusifolia</i> 150 mg/kg	188 $\pm$ 12	208 $\pm$ 17 <sup>1</sup>	145 $\pm$ 12 <sup>1b</sup>

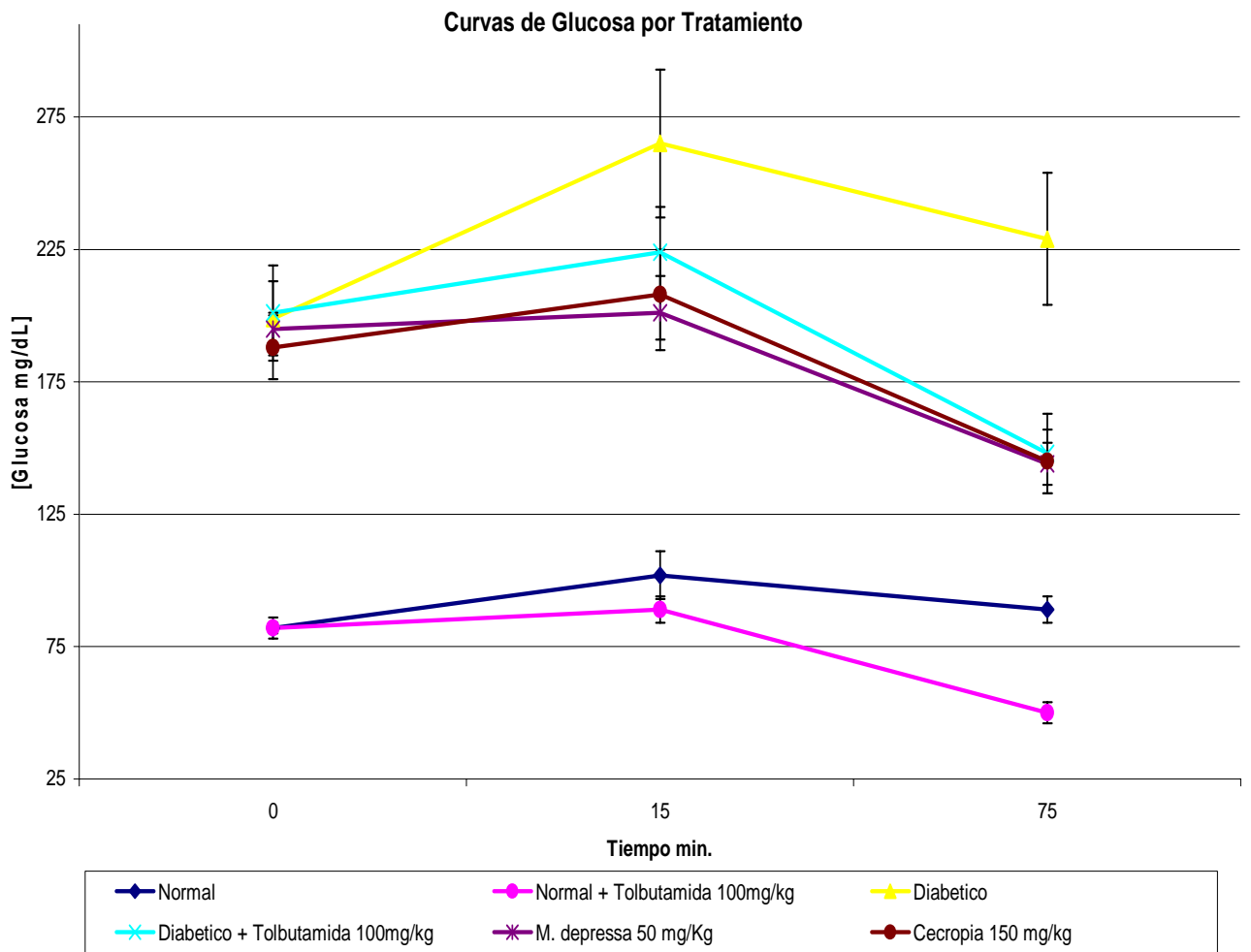
Tabla 4. Valores medios de glucosa  $\pm$  el error estándar en cada tratamiento

1 muestra diferencias significativas contra el control en el tiempo de la muestra

<sup>a</sup> muestra diferencias significativas contra el tiempo cero

<sup>b</sup> muestra diferencias significativas contra el tiempo cero y el control en el tiempo de la muestra.

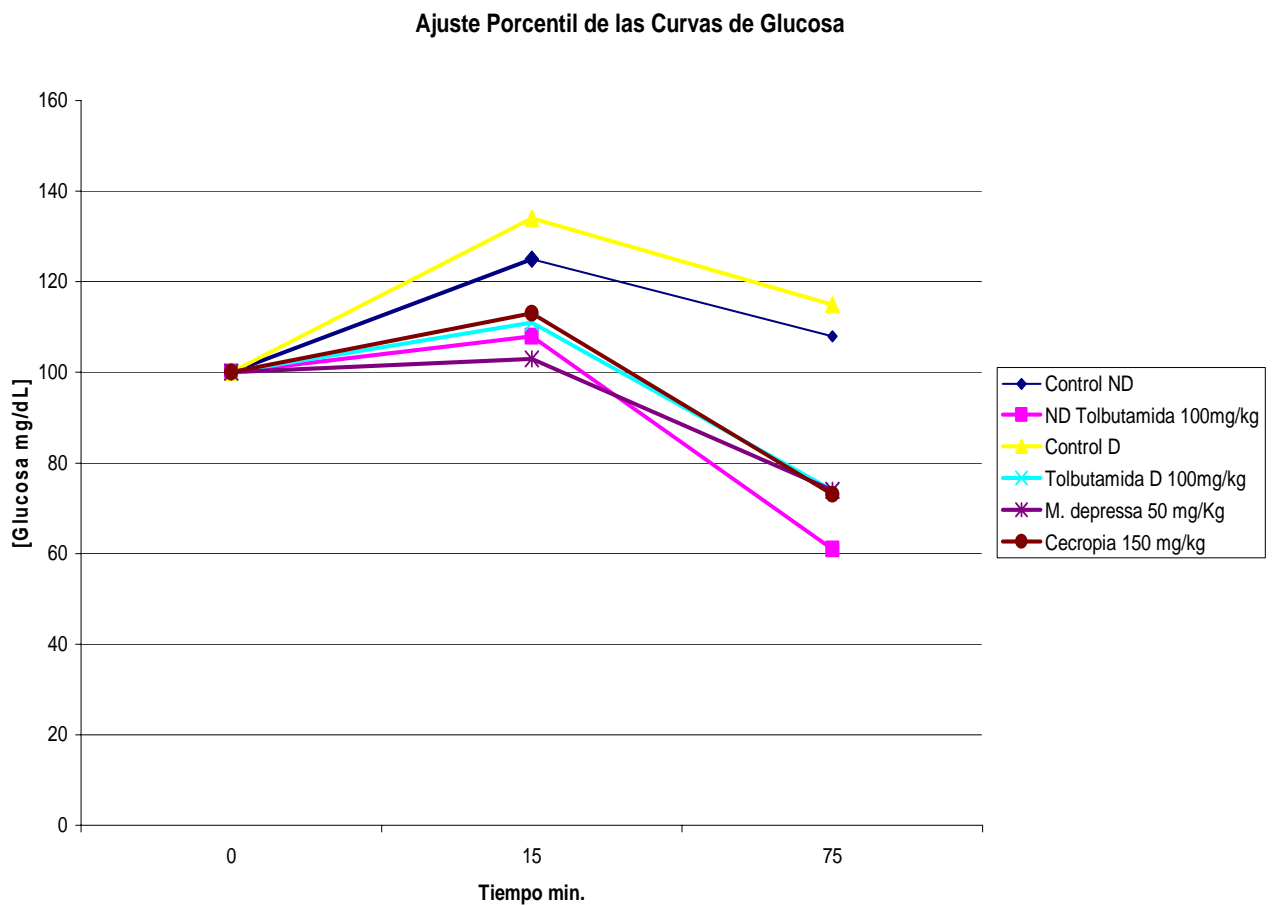
Significancia a partir de  $p \leq 0.05$



Grafica 1. Curvas de glucosa en sangre de los diferentes tratamientos,

Se observa que el extracto butanólico de *Cecropia obtusifolia* presenta un efecto similar a la Tolbutamida, y el efecto que muestra el extracto butanólico de *M. depressa* esta por debajo de estos dos tratamientos.

Para tener una mayor apreciación del efecto sobre los niveles de glucemia de la secreción de insulina se realizó el ajuste porcentil de los datos; en la Gráfica 2 se observa la similitud en el efecto sobre la secreción de insulina en los grupos experimentales de *Cecropia obtusifolia* Bertol y *M. depressa* (Baill) Chatrou, con respecto al fármaco control Tolbutamida.



Grafica 2. Ajuste porcentil de las curvas de glucosa por tratamiento.

Los valores medios de insulina obtenidos con los diferentes tratamientos se muestran en la siguiente Tabla 5, y la gráfica 3.

Grupo Exp./ Tiempo min.	Media de insulina [ng/mL] $\pm$ error estándar		
	0	15	75
Normal	2.015 $\pm$ 0.22	1.631 $\pm$ 0.20	1.902 $\pm$ 0.48
Normal + Tolbutamida 100mg/kg	2.408 $\pm$ 0.52	3.011 $\pm$ 1.22	4.992 $\pm$ 0.82 <sup>1a</sup>
Diabetico	2.118 $\pm$ 0.10	2.089 $\pm$ 0.10	2.361 $\pm$ 0.38
Diabético +Tolbutamida 100mg/kg	2.540 $\pm$ 0.48	3.238 $\pm$ 0.92	5.036 $\pm$ 0.90 <sup>1a</sup>
Diabetico + M. depressa 50mg/kg	1.879 $\pm$ 0.18	3.406 $\pm$ 0.42 <sup>1a</sup>	2.198 $\pm$ 0.24
Diabetico + C. obtusifolia 150 mg/kg	1.926 $\pm$ 0.04	2.248 $\pm$ 0.10 <sup>1</sup>	3.008 $\pm$ 0.49

*Tabla 5 Valores medios de insulina por tratamiento*

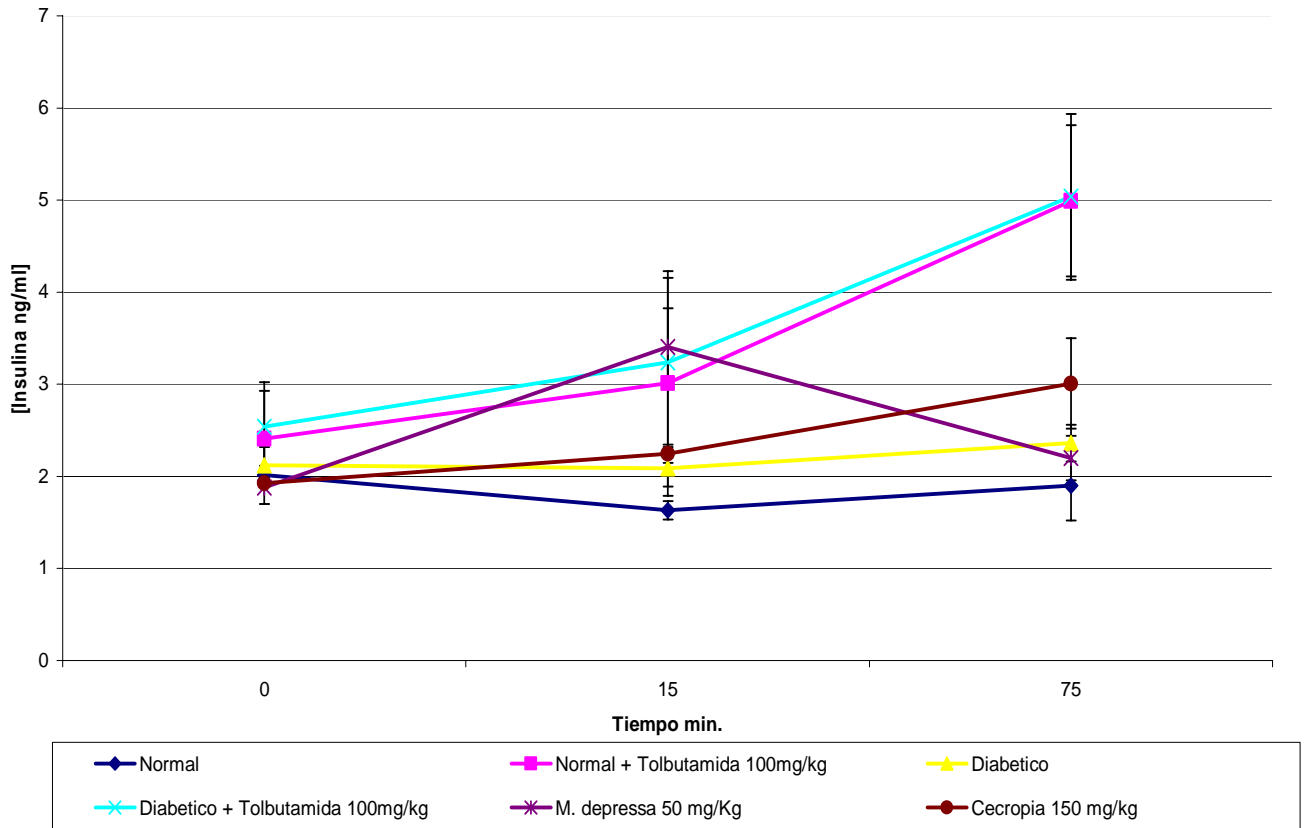
<sup>1</sup> muestra diferencias significativas contra el control en el tiempo de la muestra

<sup>a</sup> muestra diferencias significativas contra el tiempo cero

<sup>b</sup> muestra diferencias significativas contra el tiempo cero y el control en el tiempo de la muestra

Significancia a partir de  $p \leq 0.05$

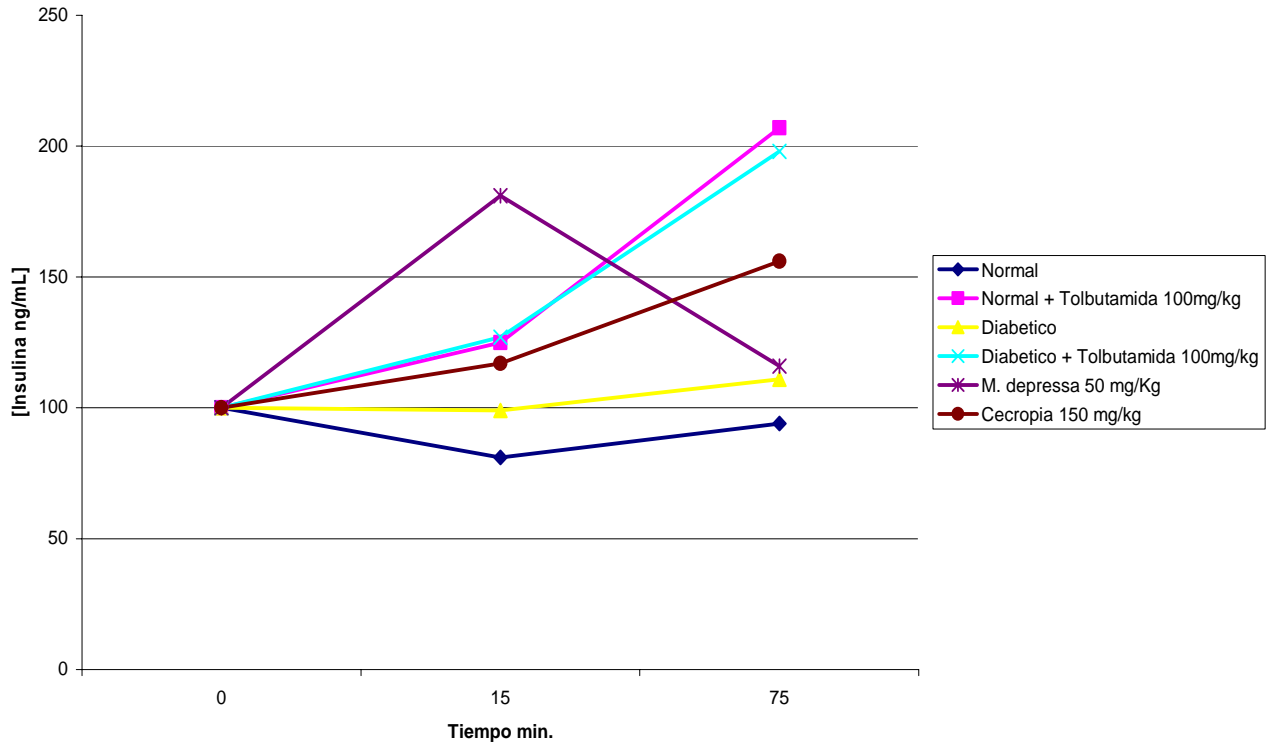
Curvas de Insulina en los diferentes tratamientos



Gráfica 3. Curvas de insulina en plasma.

En este gráfico se puede apreciar la estimulación sobre la secreción de insulina de *M. depressa* en el tiempo 15 (T 15) comparada con la Tolbutamida, y el comportamiento del extracto butanólico de *C. obtusifolia* presenta un comportamiento más atenuado pero similar a la Tolbutamida.

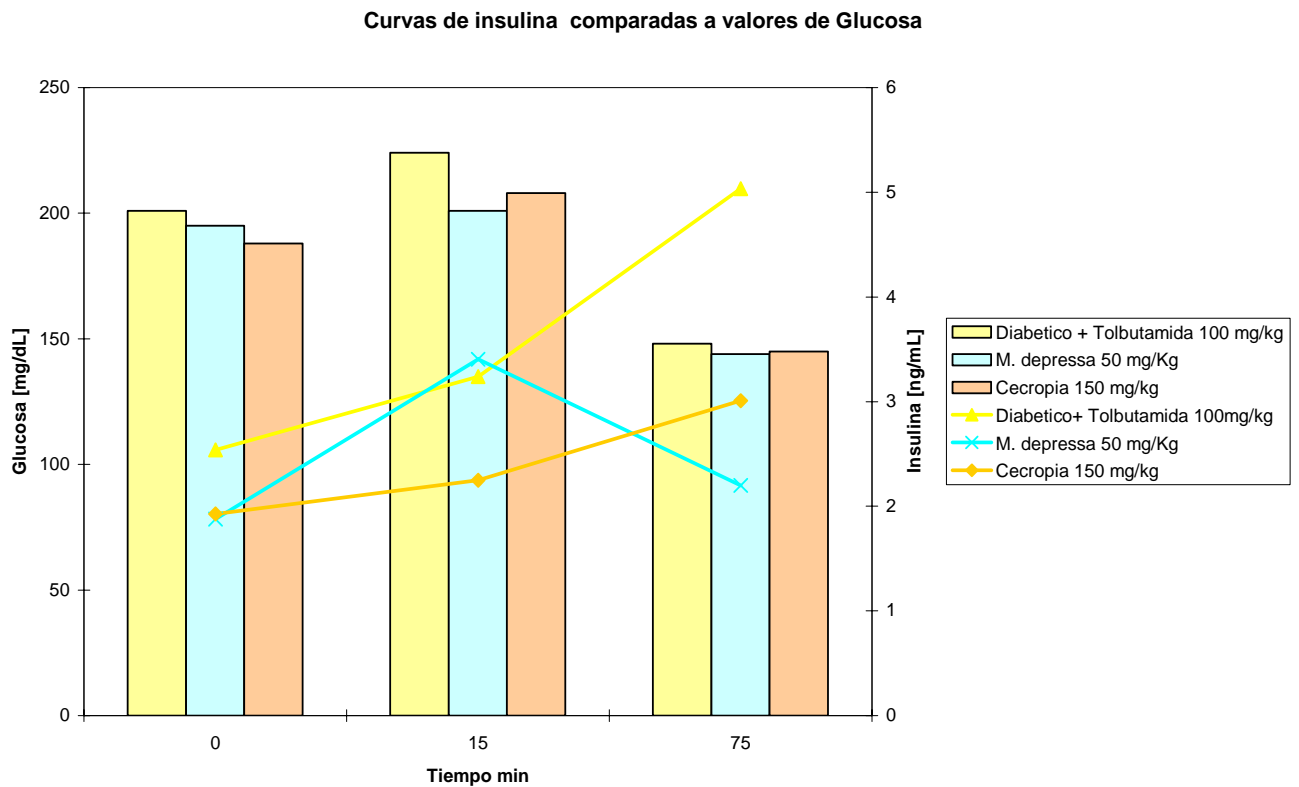
### Ajuste percentil de las Curvas de Insulina



Gráfica 4 Ajuste percentil de las Curvas de Insulina por tratamiento

En este gráfico podemos observar que el efecto de *M. depressa* sobre la secreción de insulina es mayor que el efecto de Tolbutamida y el extracto de *C. obtusifolia* en el tiempo 15 (T 15).

Para tener una mejor percepción del efecto *M. depressa* y *C. obtusifolia* sobre la secreción de insulina, se muestra a continuación la Gráfica 5 donde las curvas de insulina son comparadas con los valores de glucosa de los diferentes tratamientos en los tiempos correspondientes.



Gráfica 5. Comparación entre las curvas de insulina y los valores de glucosa de *M. depressa*, *C. obtusifolia* y Tolbutamida.

Esta gráfica presenta el comportamiento de la glucosa con los diferentes tratamientos utilizados: las barras representan los valores medios de glucosa; mientras las líneas simbolizan las curvas de insulina de *M. depressa*, *C. obtusifolia* y Tolbutamida.



## 15. DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra que los extractos butanólicos de *M. depressa* (Baill) Chatrou, a una dosis de 50 mg/kg., y *Cecropia obtusifolia* Bertol, a una dosis de 150 mg/kg., producen un efecto sobre la secreción de insulina basal en ratas diabéticas (n-STZ), en comparación con el control diabético en donde los valores de insulina se mantuvieron estables.

Las dosis fueron establecidas de acuerdo a lo publicado por Ohta y colaboradores (1999) que proponen que la dosis de 100mg/kg de tolbutamida presenta un efecto mayor en la secreción de insulina, en ratas nSTZ a los 15 minutos de administración, comparado con dosis de 10 y 30 mg/kg. Por lo tanto, la dosis de los extractos butanólicos de las plantas utilizadas fue llevada a una relación de 1:10. De esta manera se pudo observar el efecto sobre la secreción de insulina diferenciado en cada tratamiento.

Se utilizó este modelo animal (ratas diabéticas n-STZ) porque presenta una deficiencia sobre la secreción de insulina, lo que nos permitió probar si los extractos butanólicos de las plantas con actividad hipoglucemiante, mostraban un efecto sobre la secreción de insulina.

El manejo de las ratas produce estrés y como resultado tenemos el aumento de la concentración de glucosa en sangre en las mediciones del tiempo 15, debido al estrés que produce la toma de muestra, esto también lo presentan el grupo de ratas normales y las diabéticas sin tratamiento.

Las plantas utilizadas se encuentran referidas en la literatura, con una actividad hipoglucemiante en modelos farmacológicos para el estudio de diabetes mellitus tipo 2, en relación a *M. depressa* Martínez-Zurita (2004) reporta una actividad hipoglucemiante en ratas diabéticas, a los 60 min. de administrado el extracto acuoso; además, se han realizado estudios de la composición química de los extractos butanólicos de *M. depressa* y *C. obtusifolia*, anteriormente publicados por Andrade –Cetto y colaboradores (2001, 2005), con lo que se tiene la certeza de que estos extractos poseen uno o más principios activos.

El extracto butanólico *M. depressa* (Baill) Chatrou a una dosis de 50 mg/kg presentó una estimulación sobre la secreción de insulina a los 15 min. de administrado, lo que nos hace pensar que existe un efecto sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ), provocado por alguno o algunos de los compuestos aislados de esta planta que reporta Andrade-Cetto y Martínez-Zurita et al (2005). El efecto de *M. depressa* (Baill) Chatrou comparada con el efecto de Tolbutamida en la estimulación de la secreción de insulina es mayor en el tiempo 15, mientras que el efecto de la Tolbutamida va en aumento. En cuanto a los niveles de glucosa en sangre, *M. depressa* (Baill) Chatrou muestra diferencias significativas contra el tiempo 0 en ratas normales y en ratas diabéticas, lo anterior nos sugiere que esta planta es utilizada correctamente por las comunidades mayas para el tratamiento de la diabetes ya que los efectos que se observaron en este estudio comprueban que les ayuda a controlar la hiperglucemia.

El extracto butanólico de *Cecropia obtusifolia* Bertol a una dosis de 150 mg/kg. muestra una tendencia similar a la tolbutamida, es decir, hay una secreción moderada en el tiempo 15 y se incrementa a los 75 minutos, pero es más atenuado que el efecto de la Tolbutamida; en cuanto a los niveles de glucosa *C. obtusifolia* Bertol se comporta como la tolbutamida. Andrade-Cetto y colaboradores en 2001 reportan una posible actividad sobre la producción hepática de glucosa; Becerra Jiménez (2005) reporta una actividad en la absorción de sacáridos a nivel intestinal. En este trabajo es visible que además de estas acciones muestra una predisposición a aumentar la secreción de insulina.

De acuerdo a lo anterior, se puede aseverar que *C. obtusifolia* Bertol y *M. depressa* (Baill) Chatrou, plantas utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de la diabetes en nuestro país, se pueden manejar en pacientes con reciente diagnóstico de diabetes para controlar la glucemia en ayuno y así retardar algunas complicaciones propias de la enfermedad.

Finalmente cabe señalar, que este es el primer reporte relacionado con el efecto sobre la secreción de insulina que muestran los extractos butanólicos de *M. depressa* (Baill) Chatrou y *Cecropia obtusifolia* Bertol, en un modelo

farmacológico aceptado. Sin embargo, cabe la posibilidad de probar los compuestos activos de la planta por separado para probar cual presenta un efecto sobre la secreción de insulina y de esta manera podría convertirse en una planta potencialmente útil en la elaboración de un fitomedicamento, el cual sería de gran interés para la población nacional, por el bajo costo, y en especial para la población rural que no cuenta con los recursos necesarios para poder comprar un hipoglucemiante comercial. Además del aprecio cultural desarrollado en las comunidades indígenas del sureste del país, lo que serviría como validación de su conocimiento.

## 16. CONCLUSIÓN

- El extracto butanólico de *M. depressa* (Baill) Chatrou, a una dosis de 50 mg/kg., presenta una actividad hipoglucemiante y un efecto sobre la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ).
- El extracto butanólico de *C. obtusifolia* Bertol, a una dosis de 150 mg/kg., presenta una actividad hipoglucemiante y tiende a incrementar la secreción de insulina en ratas diabéticas (n-STZ).
- Es necesario aumentar el número de animales por grupo, para reducir la varianza de los datos y tener una mejor percepción del efecto sobre la secreción de insulina que exhiben estas plantas.
- Se debe desarrollar un modelo animal de resistencia a la insulina para poder probar estos extractos y saber si presentan una actividad sobre la sensibilidad de captación de insulina y el consecuente transporte de glucosa.

## 17. BIBLIOGRAFÍA

1. A.D.A. 2004. American Diabetes Association. Página de Red: [www.diabetes.org](http://www.diabetes.org); accedida en septiembre de 2006.
2. Adult Treatment Panel III. JAMA 2001; 285: 2486-97.
3. Andrade Cetto, A. 1999. Estudio etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal & Chalm. Y *Cecropia obtusifolia* Bertol. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. 100p.
4. Andrade-Cetto, A. and Wiedenfeld H. 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 78, 145-149.
5. Andrade-Cetto A. y Hienrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology. 99, 325-48.
6. Andrade-Cetto, A., Martinez-Zurita, E. and Wiedenfeld, H. 2005. Hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology.
7. Andres R., Swerdloff R., Pozefsky T., Coleman D. 1966, Manual feedback technique for the control of blood glucose concentration. In: Skegge LT Jr (editor): Automation in analytical chemistry. New York. 1966 pp. 486 – 491
8. Argueta, A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. INI, México. 3 Tomos.

9. Bajaj, Mandeep , and DeFronzo Ralph A., 2003, Metabolic and molecular basis of insulin resistance, Topics in Molecular Biology, University of Texas, San Antonio, Tex., 311-323.
10. Barg S. 2003. Mechanims of Exocytosis in Insulin- Secreting  $\beta$ -cells and Glucagon- Secreting  $\alpha$ -cells. Pharmacology and Toxicology, 92, 3-13.
11. Becerra-Jiménez J., 2005. Estudio sobre el efecto de 5 plantas hipoglucemiantes mexicanas sobre la absorción de glucosa intestinal, en rats (n-STZ) diabéticas. Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 75 pp.
12. Berne, R. y Levy, M. 2002. Principles of Physiology. Elsevier Science imprint, pp.499-517.
13. Bonnier-Weir S., Trent D.E., Honey R.N., Weir G.C.1981. Response to neonatal islets to streptozotocin: Limited  $\beta$  cell regeneration and hyperglycemia. Diabetes 30, 64-9.
14. Crystal Chemical INC., 2003, Ultrasensitive Rat insulin ELISA Instruction, v.3, 1-18.
15. Doyle, M. and Egan 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. Pharmacological Reviews. Vol 55 Issue 1, 105-131.
16. Han T.S., Lean M.E.J. 2006, Metabolic Syndrome, Medicine, doi: 10.1053/j.mpmed.2006.09.012
17. Harano Y., Ohgaku S., Hidaka H., Haneda K., Kikkawa R., Shigela Y. 1977. Glucose, insulin and somatostatin infusions for measurement of in vivo insulin resistance. J. Clin. Endocrinol. Metab. ; 45: 1124 – 1127.
18. Harris M., Flegal K.M., Eastman R.C., Eberhardt M.S., Cowie C.C. 1998 Racial and ethnic differences in glycemic control of adults with type 2 diabetes. Diabetes Care. 22:403-8

19. Holmstedt B., and Bruhn Jan G. 1983. Ethnopharmacology-A challenge, *Journal of Ethnopharmacology*, 7: 251-256.
20. Jimenez, A., Mata, B., Lotina, B., Anaya, A. y Velasco, L. 1996. Phytogrowth-inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *Journal of Natural Products*. 59, 202-204.
21. Laclaustra Gimeno Martin, Bergua Martínez Clara, Calleja Pascual Isaac, Casasnovas Lenguas José A., 2006, Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología, *Revista Española de Cardiología*, 5: 3-10.
22. Lehninger Nelson D.L. & Coc. M.M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*, 3ª Ed. 2000, Editorial Omega
23. LeDoux , S.P.; Woodley, S.E., Patton,N.J., and Wilson, G.C. 1986. Mechanims of nitrosurea- induced  $\beta$  cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes* 35, 866-872.
24. Martínez Zurita Eddy C., 2004, Efecto hipoglucemiante de *Malmea depressa* (Baillon) R.E. Fries, Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 75 pp.
25. Miranda J.P., De Fronzo R.A., Califf R.M., Guyton J.R. Metabolic syndrome: Definition, patophysiology and mechanims. *Am Heart J*. 2005; 149: 33-45.
26. Moller David E., 2001. New drug targets for Type 2 diabetes and the metabolic syndrome, *Nature*, 414, 821-827.
27. Mooradian A.D. 1996 Drug therapy of non-insulin-dependent diabetes mellitus in elderly. *Drugs*. 51:931-41.

28. Najjar Sonia, 2001. Insulin action: molecular basis of diabetes, Encyclopedia of life science, Nature Publishing Group, 1-10.
29. ntp.niehs.nih.gov, accesada en Diciembre de 2006.
30. Okamoto H. 1981. Regulation the proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. Mol. Cell. Biochem., 37, 43-61.
31. Otha, T., Furukawa N., Yonemori F., Wakitany K., 1999. JTT-608 controls blood glucose by enhancement of glucose- stimulated insulin secretion in normal and diabetes mellitus rats. European Journal of Pharmacology. 367: 91-99
32. Petersen Kitt Falk, and Shulman Gerald I., 2006, Etiology of Insulin Resistance, The American Journal of Medicine, vol. 119 (5A), 10S-16S.
33. Pennington, T.D y Sarukan, K. 1998. Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. UNAM Instituto de Ecología-Fondo de Cultura Económica.
34. Portha B., Picolon L., Rosselin G. 1979. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. Diabetologia.17, 371-7.
35. Reaven, G.M. 1983. Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Does it exist and can it be measured? Am. J. Med.; 74: 1A, 3 - 17
36. Revilla M.C., Andrade-Cetto A., Palomino Garibay M.A., Wiedenfeld H. e Islas-Andrade S. 2007. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. Journal of ethnopharmacology, in press, available on line.



37. Roman-Ramos, R., Flores, J., Partida, G., Lara, A. y Alarcón, F. 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. Arch. Invest. Med. (Mex) 87-93.
38. Ross Stuart A., Gulve Eric A., Wang Minghan, 2004, Chemistry and Biochemistry of type 2 diabetes. Chemical Reviews, 104: 1255-1282.
39. Saad M.F., Anderson R.L., Laws A., Watanabe R.M., Kades W.W., Chen Y.D. 1994. A comparison between the Minimal Model and the Glucose Clamp in the assessment of insulin sensitivity across the spectrum of glucose tolerance. Diabetes, 43: 1114 – 1121
40. Shen S.W., Reaven G.M., Farquhar J.W. 1970. Comparison of impedance to insulin-mediated glucose uptake in normal subjects and in subjects with latent diabetes J. Clin. Invest. 49: 2151 – 2160
41. Schultes, O. 1991. Historical perspective and future of ethnopharmacology. Journal of Ethnopharmacology 32: 7-24.
42. Soumyanath Amadala. 2006. Traditional Medicines for Modern Times Antidiabetic Plants. Taylor and Francis group. Boca Florida, EU. 314 pp
43. Standley, P., y Steyermark, J., 1946. Flora de Guatemala. Part IV. Fieldiana, Botany 24, 270-294.
44. Technical guide for ELISA. Página de Red: [www.kpl.com](http://www.kpl.com) ; accedida en marzo de 2006
45. Trejo, G.M. 1983. Estudio fitoquímico del Guarumbo (Cecropia obtusifolia) como agente hipoglucemiante. Tesis de Licenciatura. ENCB, INP. 55 p.

46. WHO. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. 59p.

47. WHO.2005. World Health Organization . Página de Red : [www.who.int](http://www.who.int); accedida en septiembre de 2006.

## 18. APÉNDICE

El kit ELISA utilizado para la cuantificación de insulina en plasma es el proporcionado por CRYSTAL CHEM INC. Ultra sensitive Rat Insulin Elisa Kit que marca el siguiente protocolo:

- Fijar al microplato los pozos
- dispensar 95 $\mu$ L del diluyente de la muestra en cada pozo
- Pipetear 5 $\mu$ L de la muestra y colocarlos en el pozo correspondiente
- Almacenar el microplato con los pozos a 4°C por 2 horas
- Lavar 5 veces con buffer de lavado
- Dispensar 100 $\mu$ L del conjugado en cada pozo
- Almacenar el microplato a temperatura ambiente por 30 minutos
- Lavar 7 veces con buffer de lavado
- Dispensar 100 $\mu$ L de TMB en cada pozo
- Dejar reaccionar por 40 minutos a temperatura ambiente sin exponer el microplato a la luz
- Dispensar 100 $\mu$ L de solución STOP
- Medir la absorbancia a 450nm
- Calcular la concentración de insulina de acuerdo a la curva estándar.

El principio de la prueba se describe a continuación:

- Primera reacción: La muestra de insulina de rata estimula la unión del anti-ratinsulin (antígeno) al anticuerpo de cobayo pegado al micropozo.
- Lavado: Los materiales que no se unieron al micropozo son removidos por lavado.
- Segunda reacción: Se agrega el POD (enzima peroxidasa) conjugado y se une al complejo inmovilizado en el micropozo de antirat insulin-anticuerpo/insulin.
- Lavado: el exceso de conjugado es removido por lavado.
- Reacción enzimática: la unión del conjugado en el micropozo es detectada por 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (tmb) solución sustrato.
- Medida de absorbancia por Stat Fax
- Evaluación de los resultados: la concentración de insulina de rata es determinada por la curva estándar obtenida del ploteo de la absorbancia, versus la concentración de la insulina de rata estándar.