



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFECTO DE *Opuntia streptacantha* Lem.
SOBRE LA ABSORCIÓN DE GLUCOSA A
NIVEL INTESTINAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BECERRA JIMÉNEZ JAIME

DIRECTOR DE LA TESIS: Dr. Adolfo Andrade Cetto

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2008.



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de Septiembre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **JAIME BECERRA JIMÉNEZ** con número de cuenta **98195611** con la tesis titulada **"EFECTO DE *Opuntia streptacantha* Lem. SOBRE LA ABSORCIÓN DE GLUCOSA A NIVEL INTESTINAL"**, realizada bajo la dirección del **DR. ADOLFO ANDRADE CETTO**:

Presidente: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER
Vocal: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
Secretario: DR. ADOLFO ANDRADE CETTO
Suplente: DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE
Suplente: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de Noviembre de 2008.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca recibida para la realización de los estudios de maestría.

A PAPIIT (proyecto 202603) por haber financiado parcialmente este trabajo de investigación.

A DGEP a través de su programa “Movilidad Internacional de Estudiantes” por la beca complementaria recibida para realizar la estancia de investigación de tres meses en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania.

A PAEP por la beca complementaria recibida para realizar la estancia de investigación de tres meses en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania.

Muy especialmente a los miembros de mi Comité Tutorial:

Dr. Adolfo Andrade Cetto.

Dr. René de Jesús Cárdenas Vásquez.

Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto por darme la oportunidad de trabajar en una de mis grandes pasiones: "Las plantas medicinales".

Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez con quien trabajé estrechamente y al que debo un crecimiento importante como investigador.

A mis sinodales:

Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero

Dra. María Cristina Revilla Monsalve.

Dr. Robert Arthur Bye Boettler.

...por sus oportunas y acertadas sugerencias que ayudaron a mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Helmut Wiedenfeld, por abrirme las puertas para trabajar en el laboratorio que preside y por su asesoría y trabajo conjunto en la parte fitoquímica del trabajo presentado.

A los miembros del Bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM:

M.V.Z. Mario J. Soriano Bautista.

Biol. Dora Maria Salazar Castelo.

Biol. María Isabel Antunez de la Rosa.

M. en C. Agustin Carmona Castro.

...por su apoyo en el manejo de los animales experimentales.

DEDICATORIA

A mi familia...

*“The happiest moments of my life have been the few which
I have passed at home in the bosom of my family”.*

THOMAS JEFFERSON

A mi madre, ejemplo de fortaleza y entereza, por su apoyo en toda situación.

A mis hermanos Rodrigo, Cintya y Victor, porque juntos hemos crecido y madurado. Gracias por todo su apoyo, porque juntos hemos recorrido grandes caminos y nos esperan muchos más por descubrir.

A mi padre por apoyo.

A Ana, Palapa y Paty por lo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio.

A Liliana, Miguel, Esteban, Roberto, Esther por su invaluable amistad y cariño.

A Astrid, por ser la gran amiga que es.

A Mayrén, por el gran lazo fraternal que me has tendido.

A la familia Mauro Garza, Ari, Adriana, Kale, Toño y especialmente Evelia, porque somos familia de corazón.

A Daniel, Javier, Manuelito y todos los Muertos por su ayuda en cada paso que doy.

*« Pour accomplir de grandes choses,
nous devons non seulement agir mais aussi rêver;
non seulement planifier, mais aussi croire ».*

Anatole France

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	
Diabetes mellitus	3
Tratamiento de la diabetes mellitus.....	6
Inhibidores de las alfa-Glucosidasas	9
Absorción intestinal de carbohidratos.....	11
Plantas hipoglucemiantes	16
Etnofarmacología	18
Modelos animales para el estudio de la diabetes tipo 2.....	21
Modelo n-STZ.....	23
ANTECEDENTES DE LA PLANTA	
Ubicación taxonómica	26
Descripción	26
Distribución.....	29
Antecedentes etnobotánicos	30
Antecedentes fitoquímicos.....	30
Antecedentes farmacológicos	31
OBJETIVO	33
METODOLOGÍA GENERAL	
Trabajo fitoquímico	34
Elaboración de extractos.....	35
Curva de tolerancia maltosa.....	37
Purificación de disacaradasas de intestino de rata.....	40
Modelo de enzima libre	41
Hidrólisis de sacarosa en intestino evertido	42
Análisis estadístico	43
RESULTADOS	
Fitoquímica	44
Curva de tolerancia maltosa.....	47
Modelo de enzima libre	49
Hidrólisis de sacarosa en intestino evertido	52
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS.....	57
LITERATURA CITADA.....	58

RESUMEN

En la actualidad la utilización del nopal como coadyuvante en la terapia contra la diabetes, se ha extendido a lo largo y ancho del territorio nacional; pero esta generalización en su uso no se encuentra sustentada con datos científicos. El presente trabajo tuvo como objetivo el determinar el efecto de *Opuntia streptacantha* sobre la hidrólisis de disacáridos, por ser uno de los mecanismos sobre los que más hipótesis se han planteando en la literatura.

En la prueba *in vivo* de curva de tolerancia a maltosa con animales n5-STZ diabéticos, los dos extractos probados presentaron un efecto antihiper glucémico estadísticamente significativo, al impedir el pico hiper glucémico a partir de los 30 minutos de su administración en comparación con el control diabético con solución fisiológica.

En el modelo de enzima libre para evaluar la actividad de *Opuntia* como inhibidor de las alfa-Glucosidasas ninguno de los extractos probados presentó actividad inhibitoria. Además, en un modelo fisiológico de intestino evertido, utilizado para determinar el efecto del extracto de *Opuntia streptacantha* sobre la hidrólisis de sacarosa, tampoco se encontró inhibición por el extracto de nopal.

El presente trabajo deja de manifiesto que el efecto “antihiper glucemiante” no es producto de la inhibición de las alfa-Glucosidasas como lo habían especulado en la literatura durante las últimas dos décadas.

ABSTRACT

Nowadays the employment of nopal as a coadjuvant in the diabetes treatment it is widespread throughout Mexico. Nevertheless, these reports lack scientific background. The aim of the present work was to determine the effect of *Opuntia streptacantha* on the disaccharide hydrolysis, because this action-mechanism has been one of the most recurrent hypotheses in literature.

In a maltose tolerance test carried out on n5-STZ diabetic animals two nopal extracts were assayed and showed a statistically significant antihyperglycemic effect. The effect was reflected as a reduction of the hyperglycemic peak which was registered 30 minutes after maltose administration

On the other hand, in a free-enzyme assay model, none of the nopal extracts exhibited an inhibitory effect upon the alpha-Glucosidases. In addition, the extract tested in the everted intestine bioassay, used to quantify the hydrolysis activity, did not produce any change in the small intestine sucrase activity.

In summary, the results of the present work indicate that the antihyperglycemic effect produced by nopal extracts can not be attributes to the inhibition of the alpha-Glucosidases as it had been speculated for some authors during the last two decades.

EFFECTO DE *Opuntia streptacantha* Lem. SOBRE LA ABSORCIÓN DE GLUCOSA A NIVEL INTESTINAL.

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS

En las últimas décadas se ha incrementado la incidencia de pacientes con diabetes tipo 2 en todo el mundo, la Organización Mundial de la Salud (W.H.O por sus siglas en inglés) estima que el número de personas diabéticas en México se incrementará de 2, 179, 000 existentes en el año 2000 a 6, 130, 000 para el año 2030, cerca de un 281%, en comparación con el incremento mundial del 214% (WHO, 2006). Lo que provoca que la prevención y el tratamiento de la enfermedad sean prioritarios en el ámbito nacional e internacional.

El término diabetes mellitus describe un desorden metabólico de etiología múltiple, caracterizado por una hiperglucemia crónica, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, por defectos en la secreción y/o acción de la insulina (WHO, 2006).

Los daños producidos a largo plazo por la hiperglucemia crónica se ven reflejados en problemas micro y macro vasculares que merman la calidad y esperanza de vida de los individuos que padecen esta enfermedad.

Son varios los procesos patogénicos que se encuentran implicados en el desarrollo de la diabetes; éstos van desde una destrucción autoinmune de las células β del páncreas, con la consiguiente deficiencia de insulina, hasta

condiciones de resistencia a la insulina. La acción deficiente de la insulina en los tejidos diana es la responsable del metabolismo anómalo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas.

Frecuentemente coexisten en el paciente una deficiente secreción de insulina con defectos de la acción de ésta, sin saberse si una de estas anomalías es la consecuencia o la causa de la otra. En cualquier caso, el resultado es la hiperglucemia. Los síntomas de una marcada hiperglucemia incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso a menudo asociada a polifagia y visión borrosa.

Las complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen principalmente: la retinopatía con pérdida potencial de visión; la nefropatía que puede conducir a un fallo renal; la neuropatía periférica con el riesgo de ulceraciones, amputaciones y la neuropatía autonómica que puede ocasionar trastornos gástricos, genitourinarios y cardiovasculares.

La glucosilación de las proteínas tisulares y otras macromoléculas y la excesiva producción de polioles a partir de glucosa, son dos de los mecanismos que se han propuesto para explicar el daño tisular resultante de la hiperglucemia crónica. Los pacientes con diabetes padecen una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, arterioscleróticas, vasculares periféricas y cerebrovasculares.

La gran mayoría de los casos de diabetes pueden incluirse en dos amplias categorías etiopatogénicas, diabetes mellitus tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud en 1999 (W.H.O. por sus siglas en inglés) y la Asociación Americana de Diabetes en 2007 (A.D.A. por sus siglas en inglés) la diabetes se clasifica en:

Tipo 1. Anteriormente se definía como diabetes insulino dependiente, resulta de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Dentro de los anticuerpos que podemos encontrar están: anticuerpos para las células del islote, anticuerpos contra insulina, anticuerpos para la ácido glutámico descarboxilasa y anticuerpos para las tirosin fosfatasa IA-2 y IA-2 β

Tipo 2. Resulta de la incapacidad para responder adecuadamente a la acción de la insulina producida por el páncreas. La diabetes tipo 2 es la más común e involucra alrededor del 90% de todos los casos de diabetes en el mundo.

Existen otros tipos de diabetes dentro de los que se encuentra la diabetes gestacional y otras anomalías relacionadas con trastornos en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, pero su incidencia es menor a los tipos antes mencionados.

Tolerancia anormal a la glucosa (TAG) y Glucosa anormal en ayuno (GAA).

Estos términos se refieren al estado metabólico intermedio entre una homeostasis normal de la glucosa y la diabetes como tal. También es referido como prediabetes. La diferencia en estos términos radica en la concentración de glucosa plasmática que consideran para definir a los individuos diabéticos. Ambas categorías toman como límite de lo normal una concentración de 109 mg/dl de glucosa plasmática en ayuno, para el TAG los individuos con niveles mayores a 110 mg/dl y menores a 126 mg/dl de glucosa plasmática en ayuno presentan este desorden metabólico, en cambio para el GAA el rango va de 110 mg/dl y hasta 140 mg/dl para definir al grupo de individuos con este problema metabólico (A.D.A. 2007).

Este estado de prediabetes es de suma importancia en la actualidad pues se ha demostrado que tiene una prevalencia mayor a la diabetes misma pero un manejo adecuado y oportuno puede significar la diferencia entre el desarrollo o no de la diabetes.

TRATAMIENTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2

Actualmente a los pacientes diabéticos se les trata en un inicio con dieta y ejercicio junto con hipoglucemiantes orales: biguanidas, sulfonilureas, meglitinidas, tiazolidindionas e inhibidores de las alfa-Glucosidasas (Tabla 1), los cuales cubren las principales causas de la hiperglucemia, como son: producción de glucosa hepática, absorción de glucosa a nivel intestinal, deficiencia en la producción de insulina, resistencia periférica a la insulina. Si la terapia con hipoglucemiantes orales no resulta suficiente se implementa la utilización de insulina (Moller, 2001; Bloomgarden, 2008).

CLASE DE FÁRMACO	SITIO DE ACCION	MECANISMO DE ACCIÓN
SULFONILUREAS (glibenclamida, tolbutamida)	Receptor SU Canal de K ⁺ dependiente de ATP en células β pancreáticas	Su mecanismo de acción es el aumento de la estimulación a las células β del páncreas para la liberación de insulina

<p>BIGUANIDAS (metformina)</p>	<p>AMP-proteína cinasa en hígado y músculo</p>	<p>El mecanismo de acción es la inhibición de la gluconeogénesis hepática. La metformina activa a la AMP-proteína cinasa, un regulador celular del metabolismo de lípidos y glucosa. Como resultado se reduce la actividad de la acetil-CoA y se activa el de la oxidación de ácidos grasos.</p>
<p>MEGLITIDINAS Replaginida y nateglinida</p>	<p>Tiene una acción en los canales de K dependientes de ATP, en células β pancreáticas</p>	<p>Similares a las sulfonilureas, son promotores de la secreción de insulina., lo que resulta en una depolarización de la membrana junto con la exocitosis de insulina.</p>
<p>INHIBIDORES DE LAS ALFA-GLUCOSIDASAS (acarbose)</p>	<p>alfa-Glucosidasas del Intestino</p>	<p>El mecanismo de acción fundamental es la inhibición reversible y competitiva de las alfa - Glucosidasas en el borde en cepillo de la mucosa intestinal, produciendo el retraso en la absorción de los carbohidratos.</p>

<p>THIAZOLIDINEDIONAS (Pioglitazona, Rostiglazona)</p>	<p>PPARγ en tejido adiposo, músculo, hígado</p>	<p>Como principal mecanismo de acción está la reducción de la resistencia periférica a la insulina y la mejora de la sensibilidad a ésta.</p> <p>Son agonistas selectivos del receptor gama del activador de la proliferación del peroxisoma, un miembro de la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas. Los cuales tienen acción en el metabolismo de glucosa, ácidos grasos y colesterol.</p>
---	---	---

Tabla 1. Principales Familias de Hipoglucemiantes orales
(Modificada de Moller, 2001).

INHIBIDORES DE LAS ALFA-GLUCOSIDASAS

Los inhibidores de las alfa-Glucosidasas son utilizados, en pacientes diabéticos con un diagnóstico reciente o en aquellas personas que se encuentran en una etapa prediabética, donde el manejo de la glucemia postprandial puede retardar la progresión del paciente a diabetes tipo 2 (Chiasson, 2002).

El reconocimiento de la importancia del manejo de la glucemia postprandial no es reciente, en 1973 Puls y colaboradores sugirieron el manejo de la hiperglucemia postprandial, a través de la inhibición de las enzimas localizadas en el tracto digestivo encargadas de degradar los carbohidratos.

Son las enzimas conocidas como alfa-Glucosidasas las encargadas del desdoblamiento de los oligosacáridos presentes en la dieta, mediante la hidrólisis de los enlaces o-glucosídicos para obtener las unidades básicas o monosacáridos. Estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana epitelial de los bordes de cepillo del intestino delgado.

La acarbosa es el agente inhibidor de las alfa-Glucosidasas, más utilizado en la actualidad. Estructuralmente la acarbosa es un pseudotetrasacárido (Figura 1), análogo a la maltotetraosa, y está compuesta por dos partes; primero una estructura de un pseudodisacárido, la acarviosina (valienaminil-4-amino-4,6-dideoxiglucosa), que está unida a la segunda parte, un residuo de maltosa, por un enlace α -1,4 (Wehmeier, 2004).

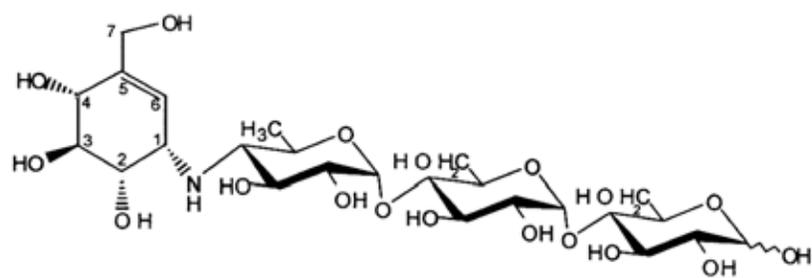


Figura 1. Estructura de la acarbosa

ABSORCIÓN INTESTINAL DE CARBOHIDRATOS

El intestino delgado (ID) es la sección del tubo digestivo que comprende desde el esfínter gastro-duodenal o píloro hasta el esfínter ileo-cecal; se divide en tres porciones: duodeno, yeyuno e ileon y se encuentra sujeto al resto del cuerpo a través del mesenterio que se une al peritoneo; así recibe su irrigación por medio de las arterias y venas mesentéricas.

El intestino delgado tiene un lumen con una superficie mucho mayor a la que pudiese esperarse, esto es debido a que el ID tiene pliegues conocidos como vellosidades y a su vez los enterocitos, células características de éste, tienen proyecciones de la membrana llamadas microvellosidades, lo cual aumenta la superficie de contacto en un humano adulto a aproximadamente 250 metros cuadrados (Figura 2).

Es en el ID donde se llevan a cabo las etapas finales de la digestión enzimática, así como la absorción de los monómeros; producto de la degradación de polisacáridos, lípidos y proteínas.

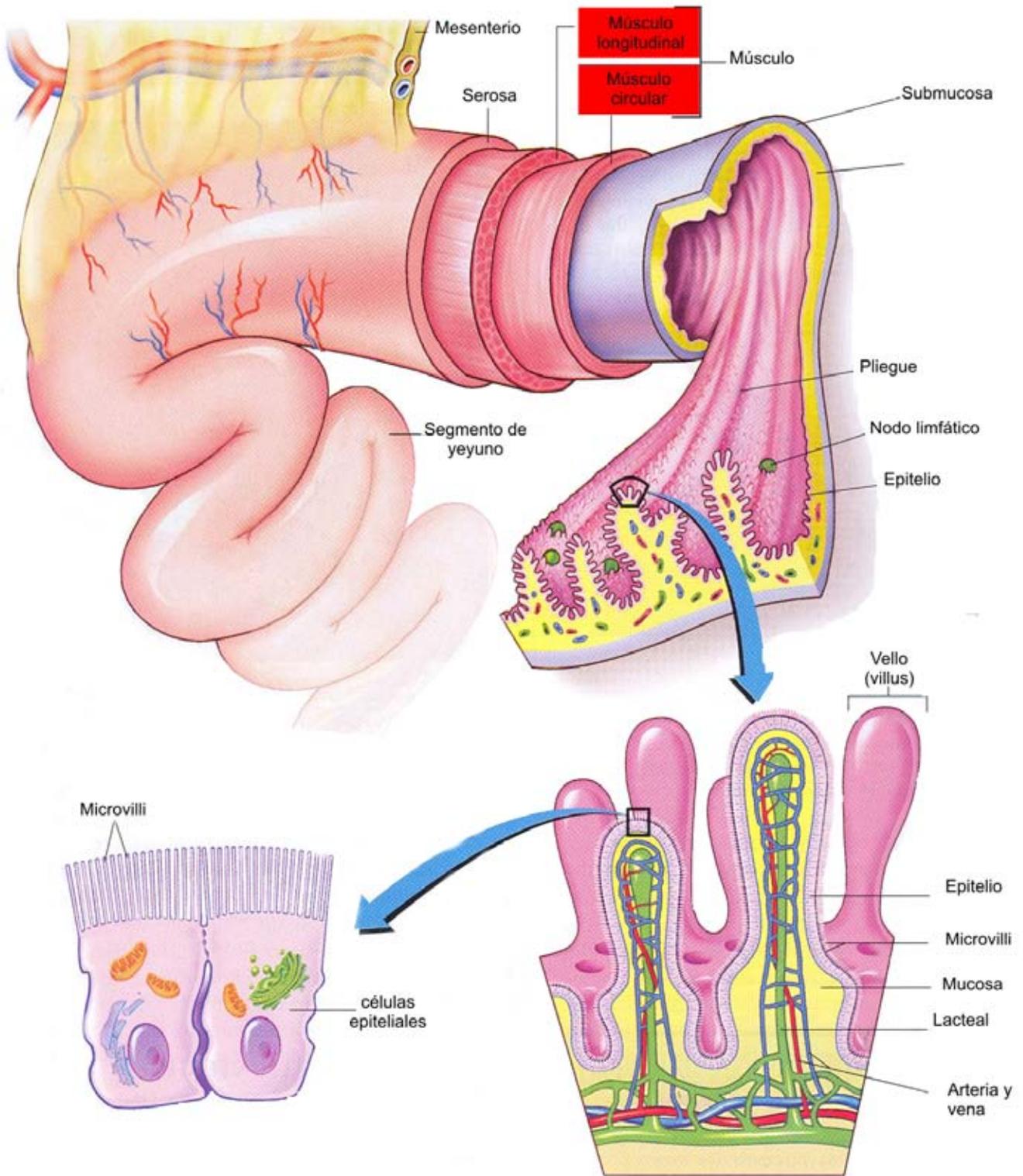


Figura 2. Superficie del lumen del intestino delgado

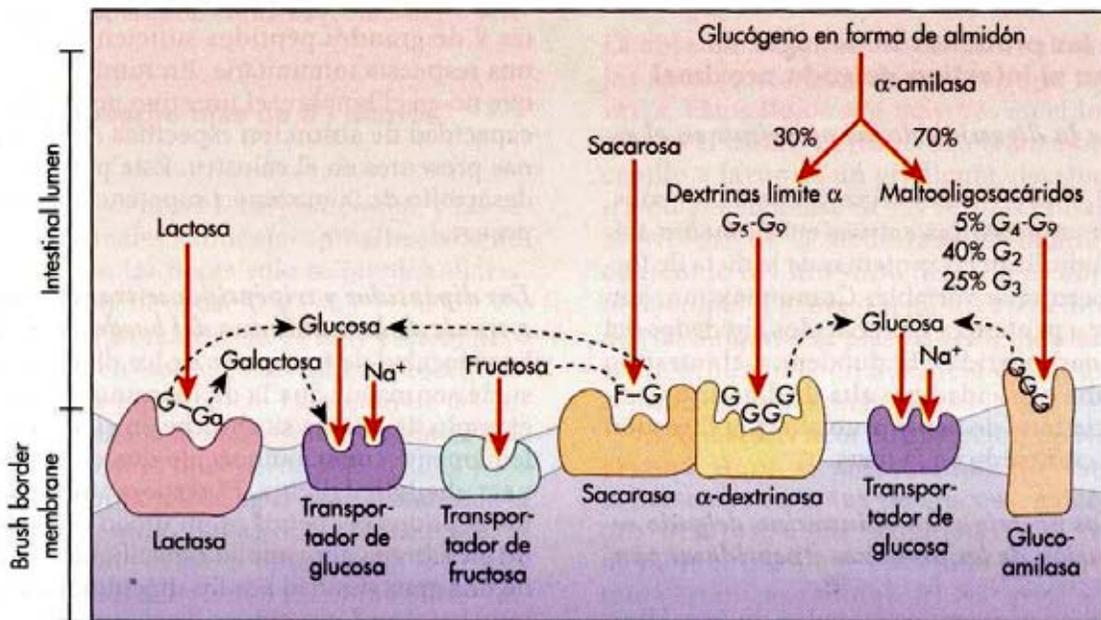
En la mayoría de los casos, las células que revisten el tubo digestivo no pueden absorber los nutrientes tal como llegan con la alimentación. La digestión consiste en los procesos de hidrólisis y absorción mediante reacciones catalizadas por enzimas tanto gástricas como las del lumen del tubo digestivo.

El almidón vegetal, amilopectina, es la principal fuente de carbohidratos en la mayoría de las dietas humanas. La amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa. Una proporción menor de almidón es la amilosa, un polímero de glucosa lineal con enlaces α 1-4. La celulosa es un polímero con enlaces β 1-4, enlace que no pueden hidrolizar las enzimas del tracto digestivo, por lo que ésta y otros polisacáridos con enlaces β forman parte de lo que se llama fibra de la dieta.

La digestión del almidón comienza en la cavidad bucal por acción de la α -amilasa (amilasa salival) la cual cataliza los enlaces internos en posición α 1-4 de la cadena principal; pero es incapaz de hidrolizar los enlaces de los puntos de ramificación α 1-6. Los principales productos de la acción de la α -amilasa son la maltosa, la maltotriosa y los oligosacáridos ramificados conocidos como dextrinas límite α . La amilasa salival se inactiva en el estómago debido al pH y ningún otro procesamiento de los hidratos de carbono tiene lugar en el estómago. El jugo pancreático tiene una α -amilasa muy activa; los productos de ésta y de la salival son los mismos pero su actividad total es considerablemente mayor.

La digestión posterior de los oligosacáridos producidos por ambas amilasas se lleva a cabo por enzimas ubicadas en el borde de cepillo de la membrana del epitelio del duodeno y el yeyuno (Figura 3). Las principales oligosacaridasas del borde de cepillo son:

- ***Lactasa** hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa.
- ***Sacarasa** hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa
- * **α -dextrinasa** (también denominada **isomaltasa**) 'desramifica' las dextrinas límite α al hidrolizar los puntos de ramificación de los enlaces α 1-6.
- ***Glucamilasa** que escinde los enlaces glucosídicos terminales α 1-4, convirtiendo los maltooligosacáridos en unidades de glucosa.



Esquema 3. Principales oligosacaridasas del borde de cepillo del intestino delgado (Tomado de Gray G M, 1975).

El duodeno y el yeyuno proximal poseen la mayor capacidad para absorber azúcares; capacidad que se pierde progresivamente desde el yeyuno distal hasta el ileon. La glucosa y la galactosa se transportan de manera transcelular por medio de un transportador denominado SGLT1, en un evento de transporte activo, donde la energía para el transporte es obtenida del cotransporte de sodio.

La fructosa no entra a las células por la misma vía que la glucosa o la galactosa; su captación es mediante un transportador específico (GLUT5). Estos tres monosacáridos salen de la células epiteliales y difunden hacia los capilares mediante un transportador situado en la membrana basolateral (GLUT2) (Figura 4).

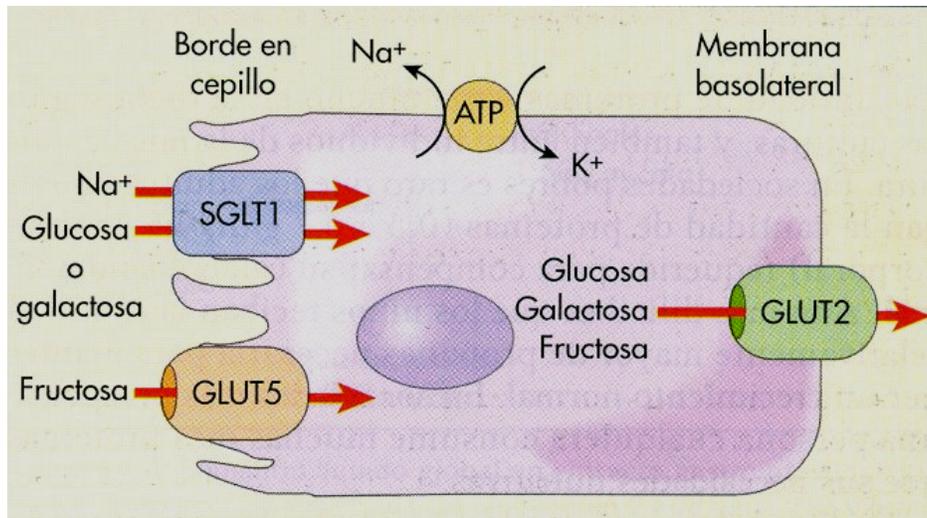


Figura 4. Transporte transcelular de los principales monosacáridos, productos de las alfa-Glucosidasas.

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 se ampliara la experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Soumyanath, 2006).

Actualmente se conocen numerosas especies con actividad hipoglucemiante, para el caso de México, Andrade-Cetto y Heinrich (2005) documentaron al menos 306 especies de 235 géneros y 93 familias que 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 por falta de estudios dirigidos, o aquellas que quedan ocultas por ser asociadas a otras patologías pero que se usan para un cuadro clínico de diabetes.

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado a nivel nacional y mundial, y de la gran cantidad de compuestos aislados de plantas reportadas en la literatura, en la actualidad sólo se ha obtenido un derivado de plantas medicinales útil como hipoglucemiante: la metformina sintetizada a partir de una molécula 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 aguda o no. Por tanto, es necesario realizar más estudios interdisciplinarios, haciendo uso de la fitoquímica para determinar el principio activo, de la farmacología para poder encontrar si existe un efecto hipoglucemiante, de la fisiología, sistemática y de otras muchas disciplinas, que permitan hacer un estudio integral que derive en un agente hipoglucemiante de interés médico (Andrade-Cetto, Heinrich, 2005).

La etnofarmacología debe ser la disciplina que de marco y sentido a las investigaciones que se interesen por el estudio de las plantas medicinales.

ETNOFARMACOLOGÍA

La etnofarmacología es un concepto reciente, surgido en la década de los 60's en el ámbito de los agentes psicoactivos. Es con el libro de Efron en 1967: "Búsqueda etnofarmacológica de drogas psicoactivas" que el término adquiere relevancia científica.

La redefinición del campo de estudio de la etnofarmacología y su método permitieron darle el valor científico que merecía, lejos de los psicotrópicos; en 1983 Holmstedt y Brunh definen a la etnofarmacología como "La exploración interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados por el hombre". Años después Schultes (1991) vierte una nueva definición como: "La observación, identificación, descripción e investigación experimental de los efectos de las drogas utilizadas en la medicina tradicional". Con este enunciado se puntualizan los sujetos de estudio de la etnofarmacología, así como cada uno de los aspectos que debe comprender un estudio completo.

Es esta documentación e investigación lo que permitirá llevar a nuevas generaciones el conocimiento que a manera de saberes; ha pasado de generación en generación, conocimiento que encierra una ideología e idiosincrasia de los pueblos que los concibieron y conservaron. Pero para aquellos que no son depositarios directos de esta tradición, resulta importante este conocimiento por los aportes que puede generar en materia médica (Heinrich, 2008).

Todas las civilizaciones y sociedades que han existido desarrollaron sistemas de atención médica, los cuales se valieron de los elementos disponibles en su entorno natural; y mediante ensayo y error, lograron identificar de su universo de plantas, animales y minerales un selecto grupo de éstos, para el tratamiento de las afecciones más comunes.

Es mediante la etnofarmacología que este conocimiento empírico debe ser evaluado, para detallarlo y documentarlo en términos científicos que permitan el análisis universal del conocimiento local (Heinrich, 2003).

La investigación etnofarmacológica debe iniciarse con el planteamiento de un método preciso y definido, que sirva posteriormente para hacer comparaciones entre comunidades de estudio (Heinrich, 2003). Una vez diseñado el método y seleccionada la comunidad de estudio correspondiente se debe hacer una documentación del conocimiento de las plantas utilizadas en la localidad; toda planta referida deberá ser correctamente determinada con ayuda de la taxonomía botánica (Andrade-Cetto, 1999) para permitir el valor científico que implica la reproducción del trabajo en cualquier momento.

El análisis fitoquímico subsiguiente permitirá identificar los componentes de la planta, dentro de los cuales se encuentran los posibles principios activos. La interpretación de la actividad biológica de los componentes encontrados deberá hacerse desde la perspectiva del uso tradicional de la planta (Holmsted y Brunh, 1983).

Para poder evaluar la actividad o propiedad medicinal de las plantas, es necesario el establecimiento de un adecuado modelo farmacológico, para probar los compuestos identificados ya sea de manera aislada o en conjunto (Andrade-Cetto, 1999).

En el caso específico del nopal existen dos grandes vacíos en su estudio, el primero es la falta de estudios etnobotánicos que reflejen su amplia utilización como planta medicinal para varias patologías en las que se incluye la diabetes, el segundo está relacionado con la caracterización fitoquímica. La cuál no se ha enfocado a los cladodios que es la parte tradicionalmente utilizada para el tratamiento de la diabetes, más aún los trabajos que han intentado relacionar

algunos de los compuestos presentes en el nopal y sus efectos hipoglucemiante o antihiperoglucemiante no han aportado estructuras químicas concretas (Ibáñez-Camacho *et al.*, 1983; Alarcón-Aguilar *et al.*, 2003).

Pese a lo anterior, la actividad antihiperoglucemiante del nopal se encuentra bien sustentada en la literatura (ver sección de antecedentes farmacológicos) aunque su mecanismo de acción no se ha dilucidado.

MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA DIBETES TIPO 2.

La investigación etnofarmacológica requiere de un modelo *in vivo* y/o *in vitro* que permita reproducir de la manera más fidedigna posible la fisiopatología que pretende atacar mediante fármacos.

La diabetes mellitus (DM) es un problema de etiología múltiple caracterizado por la hiperglucemia producto de deficiencias en el metabolismo de carbohidratos. Para el estudio de esta enfermedad se han propuesto una serie de modelos animales experimentales, que reproducen diferentes aspectos de esta compleja patología.

Existen biomodelos que desarrollan espontáneamente una hiperglucemia; es gracias a factores extrínsecos como la dieta y el ambiente; en conjunto con factores intrínsecos, los genes; que algunos animales; principalmente roedores obesos, manifiestan una deficiencia en el manejo de la glucosa y/o la insulina (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

Otro tipo de biomodelos para el estudio de la DM, son aquellos donde las alteraciones fisiológicas son producidas experimentalmente. En este grupo de biomodelos podemos destacar 5 distintas maneras de producción de animales que pueden ser considerados 'diabéticos'.

1. Métodos quirúrgicos.

La pancreotomía es un procedimiento en el cual se extirpa parcialmente la glándula para producir un incremento de la glucemia.

2. Lesiones en el hipotálamo ventro medial.

La administración de electrolitos en la zona ventro medial hipotalámica causa lesiones que provocan hiperfagia, hiperinsulinemia y obesidad (Balkan, 1991).

3. Inducción hormonal.

Altas dosis de hormonas como glucagon y glucocorticoides pueden producir hiperglucemia (Stojanovska,1990).

4. Manipulación génica

Animales transgénicos, dotados con múltiples copias de genes para insulina, desarrollan hiperinsulinemia basal crónica respuesta alterada a la insulina y a la glucosa, insulinoresistencia e intolerancia a la glucosa, lo que provoca alteración el metabolismo de carbohidratos (Shiruzi, 1991).

5. Métodos químicos

La administración de estreptozotocina o alloxan, provocan la disminución de la masa de células β del páncreas (Zhao, 1999).

El modelo n-STZ es una opción viable para observar una moderada hiperglucemia crónica, condición prevalente en los pacientes con prediabetes o diabetes mellitus tipo 2 en una etapa temprana, por estas razones además de que resulta relativamente económico, se ha convertido en una de las principales alternativas para el estudio de la diabetes mellitus.

MODELO N-STZ

La estreptozotocina es una molécula de 2-deoximetilnitroglicopiranososa (Figura 5) que produce un efecto tóxico selectivo en las células β e induce diabetes mellitus en animales de laboratorio.

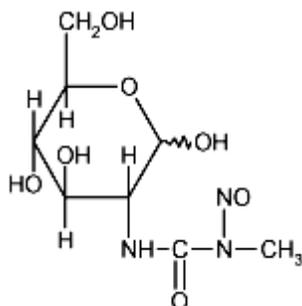


Figura 5. Molécula de estreptozotocina

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 medio de radicales libres que atacan al núcleo de las células β . Durante la descomposición de la estreptozotocina se forman iones carbonilo 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 β y provoca su muerte (Okamoto, 1981).

Las ratas neonatas tratadas con estreptozotocina al nacer (n_0 -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 ± 37 mg/dl), la insulina pancreática muestra un decremento del 93%; la insulina en plasma es baja considerando los altos niveles de glucosa, el glucagón en plasma es alto a pesar de no haber cambio en el contenido de glucagón pancreático. Las

crías sobrevivientes fueron mantenidas fácilmente y en total hubo una mortalidad menor al 30% (Portha, 1979).

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 n_0 -STZ no se distinguen de los valores en ratas control. Sin embargo, después de ocho semanas de edad las ratas n_0 -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 glucagon almacenado en páncreas (Portha *et al.*, 1979).

Una interesante variante de este modelo ha sido reportada por Bonner-Weir y Weir (Bonner-Weir, *et al.*, 1981; Weir *et al.*, 1981), en ésta se utilizan ratas Sprague Dawley inyectadas al segundo día de nacidas con 90 mg/kg de estreptozotocina (n_2 -STZ), a 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 con diabetes inducida con estreptozotocina al segundo y al quinto día después de nacer. Como consecuencia se obtuvieron tres modelos de diabetes no insulino dependientes: n_0 -STZ, n_2 -STZ y n_5 -STZ (Bonner-Weir, *et al.*, 1981).

La versión n_2 -STZ presenta las siguientes características: hiperglucemia basal con intolerancia a la glucosa, aumento en la hemoglobina glucosilada, una importante 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. Características muy similares a las obtenidas en la versión n_0 -STZ.

El desarrollo y progresión de la hiperglucemia en la versión Wistar n_5 -STZ demostró muchas similitudes a las descritas por otros autores, usando el procedimiento descrito por Bonner-Weir, et al., administrando 90 mg/kg de STZ (Bonner-Weir, *et al.*, 1981).

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 β (almacenes de insulina en el páncreas) de estas ratas diabéticas es bajo. 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 β responsables de la mediación del estímulo y la variación de acuerdo a la naturaleza del estímulo.

ANTECEDENTES DE LA PLANTA UTILIZADA.

UBICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Opuntioideae

Tribu: Opuntieae

Género: *Opuntia*

Especie: ***Opuntia streptacantha* Lem.**

DESCRIPCIÓN:

***Opuntia streptacantha* Lem.**

Planta arborescente, muy ramosa, hasta de 5 m de altura. Tronco bien definido de hasta 45 cm de diámetro. Artículos obovados a orbiculares, de 25 a 30 cm de longitud, color verde oscuro. Aréolas pequeñas, cercanas entre sí para este grupo. Espinas numerosas, extendidas, blancas; glóquidas color pardo rojizo, muy cortas. Flores de 7 a 9 cm de ancho, perianto interior de color rojizo, perianto exterior de en la gama de colores de amarillo a anaranjado, anteras verdosas o rojizas; lóbulos del estigma 8 a 12, verdes. Fruto globoso, de 5 cm de diámetro, rojo oscuro o a veces amarillento, en ambos casos por fuera y por dentro (descripción basada en Akcelrad, 2001) (Figuras 6-8).



Figura 6. Flores y frutos de *Opuntia streptacantha* Lem.



Figura 7. Cladodios jóvenes de *O. streptacantha*.



Figura 8. Planta de *O. streptacantha*.

DISTRIBUCIÓN:

En el valle de México, en los estados del Hidalgo, Estado de México y el Distrito Federal, en altitudes de 2300-2700 msnm (Akcelrad, 2001).

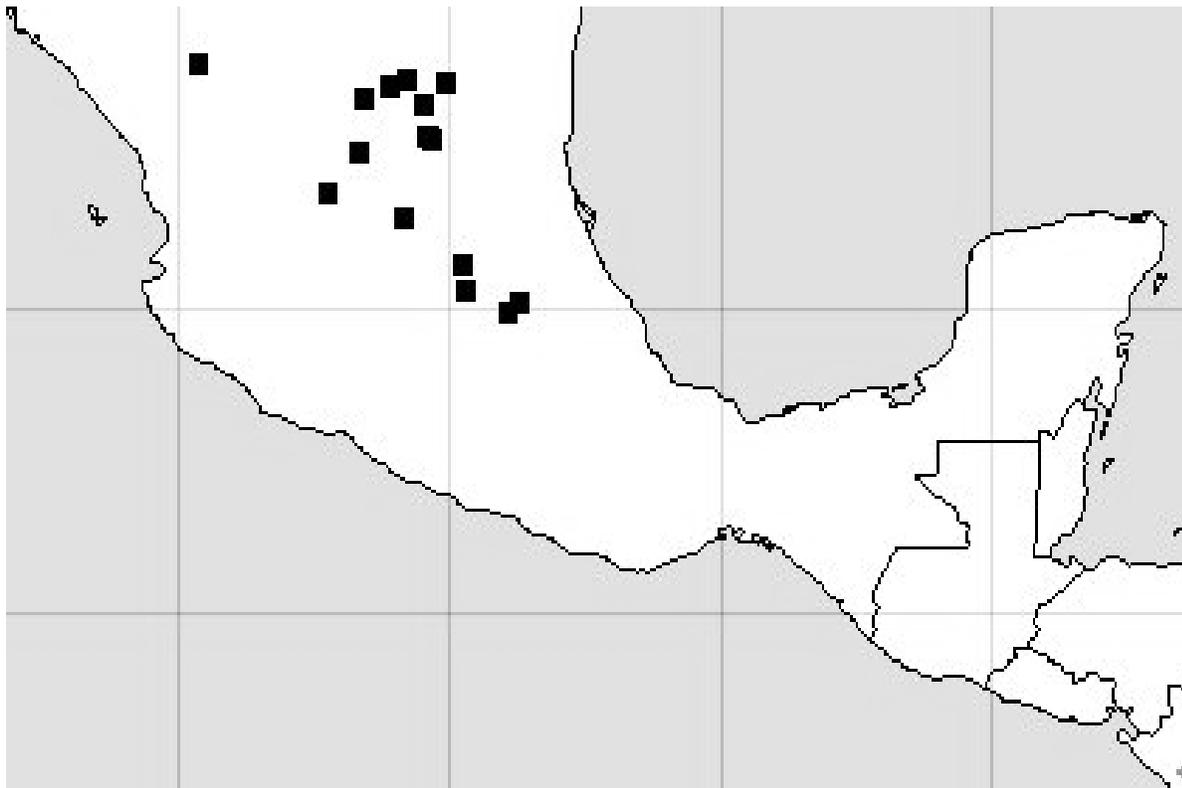


Figura 9. Distribución de *O. Streptacantha* (Missouri Botanical Garden, TROPICOS).

ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS:

El nopal se utiliza a manera de cataplasmas elaborados a partir de los cladodios y algunas veces los frutos para padecimientos como: reumatismo, quemaduras, infecciones, hidratante de la piel. También se consume como un licuado, el cual a veces se acompaña de otras plantas, para tratar enfermedades como: úlcera estomacal, disentería y diabetes (Argueta, 1994).

ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS.:

Opuntia forma principalmente dos compuestos de carbohidratos en los cladodios: los encontrados en el mucílago y las pectinas.

El polisacarido del mucílago y los de las pectinas muestran residuos de ácido, galacturónico, arabinosa, ramnosa, galactosa, xilosa y ácido urónico (Goycoolea, 2003, Alarcón -Aguilar et al., 2003)

De *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*, especie similar a *O. streptacantha*, se aislaron los siguientes compuestos (Lee, 2003):

Flavonoides; caempferol (1), quercetina (2), caempferol 3-metyl ether (3), quercetina 3-metyl ether (4), narcisina (5), (+)-dihydrocaempferol (aromadendrina, 6), (+)- dihydroquercetina (taxifolina, 7), eriodictyol (8).

Terpenoides:(6 S,9 S)-3-oxo-a-ionol-b-D-glucopyranosido (9) y corchoionosido C (10).

ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS:

Ibáñez y Meckes (1983), demuestran que una fracción semipurificada del jugo de *O. streptacantha*, produce en conejos normoglucémicos o con hiperglucemia inducida, disminución significativa de los niveles sanguíneos de glucosa y triglicéridos.

Ibáñez y colaboradores (1983) estudian el efecto hipoglucémico de *O. streptacantha* en diferentes especies de animales y en este estudio, el nopal no modifica en animales normoglucémicos la concentración basal de la glucosa.

La administración de 100 g de nopal asado 20 min. antes de los alimentos tres veces al día durante 10 días, produjo disminución significativa en el colesterol total, en los triglicéridos y en el peso corporal de los sujetos obesos no diabéticos y con diabetes tipo 2, así como una disminución en la glucemia de sujetos diabéticos (Fрати-Munari *et al.*,1983)

Una dosis de 100 g de nopal asado, administrada a voluntarios sanos, 20 min. antes de iniciar la prueba de tolerancia oral a la glucosa, impide la elevación de la glucemia a los 120 y 180 min., y disminuye la concentración de insulina sanguínea (Fрати-Munari *et al.*,1983) .

Fрати-Munari y colaboradores (1987) concluyeron que el licuado fresco de nopal, cuya especie no fue identificada, administrado por vía oral a individuos sanos, no modifica la concentración basal de la glucosa o de la insulina sérica. En contraste, se describe una acción antihiperglucemiante en individuos sanos con hiperglucemia inducida por vía oral pero no por vía intravenosa.

El mismo grupo de trabajo, muestra que la disminución de la glucosa en la sangre de individuos con diabetes tipo 2, está directamente relacionado con las dosis

administradas de nopal asado. Este efecto al que los autores llaman “hipoglucemia aguda”, lo creen independiente del producido por la fibra a nivel del tracto gastrointestinal (Fрати-Munari *et al.*,1989).

En un modelo de conejo sano, la administración oral de nopal disminuyó la curva de tolerancia a la glucosa y el pico hiperglicémico(Roman-Ramos, 1995).

En modelos animales existen reportes de una baja en la glucosa postprandial y en los niveles de HbA_{1c}, así como efectos sinérgicos con insulina, usando *Opuntia fuliginosa* (Trejo-González, 1996).

Becerra-Jiménez (2005) en su trabajo con un modelo *in vivo* para diabetes tipo 2, ratas diabéticas n5-STZ, demuestra que el efecto de *Opuntia streptacantha* Lem impide el pico hiperglicémico a los 30 minutos de su administración, en una curva de tolerancia a la maltosa, efecto similar al producido por el control positivo, Acarbosa, un fármaco inhibidor de las alfa-Glucosidasas (AGH).

Como se observa de los antecedentes *ut supra* mencionados, son varios los autores que han propuesto que la actividad antihyperglucemiante del nopal está dada por un mecanismo relacionado con la digestión de carbohidratos, ya sea en el proceso de hidrólisis o en la absorción intestinal de glucosa.

OBJETIVO

GENERAL

*Evaluar el efecto de los extractos de *Opuntia streptacantha* sobre el proceso de hidrólisis intestinal de disacáridos.

PARTICULARES

*Aportar datos para la caracterización química de *O. Streptacantha*.

*Determinar la acción de los extractos de *O. streptacantha* sobre la absorción intestinal de glucosa en ratas n₅-STZ diabéticas.

*Evaluar la actividad como inhibidores de las alfa-Glucosidasas de los extractos de *O. streptacantha*.

*Evaluar la actividad de *O. streptacantha* sobre la hidrólisis de un disacárido en un modelo fisiológico de intestino evertido.

METODOLOGÍA GENERAL.

TRABAJO FITOQUÍMICO

Para tener un control de la composición química de los extractos utilizados en ambos modelos, *in vitro* e *in vivo*, se utilizó un sistema de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) acoplado un detector de arreglo de diodos, para con ello tener los cromatogramas que servirán de perfil químico.

Para el trabajo de aislamiento e identificación de compuestos del nopal se trabajó con el jugo de los cladodios, el cuál se obtuvo prensando 1 kg de cladodios frescos de *Opuntia streptacantha* en una prensa hidráulica de la marca Hafico a una presión de 150 kg/cm².

Para la separación de los compuestos del jugo de nopal se realizó cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria Silicagel F60 (0,040 - 0,063 mm) de la marca Merck, como fase móvil se utilizó una mezcla de cloruro de metileno:metanol, iniciando la elución con una proporción 90:10 y terminando la misma con una proporción 30:70. Para la identificación de las fracciones se acopló la columna a un detector UV y se monitoreó durante todo el tiempo de elución a una absorbancia de 275 nm. Las fracciones que resultaron puras se analizaron por resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) de carbono e hidrógeno.

ELABORACIÓN DE EXTRACTOS DE *Opuntia streptacantha*.

El material botánico con el que se trabajó fue colectado por Andrade-Cetto con el número de colecta 196 en la comunidad de San Pablo Oztotepec, en la delegación Milpa Alta del Distrito Federal, México. Un ejemplar fue depositado en el Herbario IMSS bajo el número 15048.

La elaboración de extractos respondió a las necesidades de experimentación, pues no todos los extractos pudieron ser analizados en los diferentes modelos por las particularidades de cada modelo. La forma en que son presentados a continuación es respetando la cronología de su elaboración.

-Extracto Total. Se elaboró a partir de cladodios jóvenes frescos (con un peso promedio de 100 g.) a los cuales les fueron removidas las espinas para después ser molidos, a manera de licuado, en una licuadora convencional hasta obtener una mezcla de apariencia uniforme. El homogenado se ultracongeló a -40°C en un ultracongelador marca Revco y posteriormente se liofilizó en una liofilizadora marca Labconco modelo Freezone 2.5.

-Extracto Jugo. Cladodios frescos fueron prensados en una prensa hidráulica para material vegetal de la marca Hafico, el jugo se extrajo a una presión de 150 kg/cm^2 .

-Extracto Acuoso. Se elaboró a partir del extracto total, para ello se colocaron 6g de material liofilizado (correspondiente a 100 g de material fresco), en 100 mL de agua, se mantuvo en agitación por 2 horas y se dejó precipitar por espacio de 2 horas y se separó la parte líquida por decantación. La parte líquida se ultracongeló a menos 40°C en un ultracongelador marca Revco y posteriormente se liofilizó en una liofilizadora marca Labconco modelo Freezone 2.5.

-Extracto Acuoso-Centrifugado. Se elaboró a partir del extracto total, para ello se colocaron 6g de material liofilizado (correspondiente a 100 g de material fresco), en 100 ml de agua, se mantuvo en agitación por 2, retiraron las partículas insolubles por centrifugación (4,000 rpm/10 min).

-Extracto Acuoso-Filtrado. Se elaboró a partir del extracto total, para ello se colocaron 6g de material liofilizado (correspondiente a 100 g de material fresco), en 100 ml de agua, se mantuvo en agitación por 2 horas, se removió la parte insoluble por filtración con tierra de diatomeas y vacío.

-Extracto Etanol-Agua. Se elaboró a partir del extracto total, para ello se colocaron 6g de material liofilizado, en 100 ml de una solución etanol: agua en una proporción 20:80 agua, se mantuvo en agitación por 2 horas y se dejó precipitar por espacio de 2 horas y se separó la parte líquida por filtración con tierra de diatomeas y vacío. El filtrado preservado a -40°C en un ultracongelador marca Revco se liofilizó posteriormente en una liofilizadora marca Labconco modelo Freezone 2.5.

-Extracto Etanol-Ácido fosfórico. Se elaboró a partir del extracto total, para ello se colocaron 6g de material liofilizado, en 100 ml de una solución etanol: ácido fosfórico 0.01M en una proporción 20:80 agua, se mantuvo en agitación por 2 horas y se dejó precipitar por espacio de 2 horas y se separó la parte líquida por filtración con tierra de diatomeas y vacío.

CURVA TOLERANCIA A MALTOSA

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, producidas a partir de criadores certificados adquiridos a Bioterios Harlan. Se trabajó con individuos de dos y medio meses de edad y con un peso aproximado de 250g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas; 25°C de temperatura, 50% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 horas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M. Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* al alimento (Purina Ralston) y al agua.

Los animales que se utilizaron, fueron individuos con diabetes inducida por el modelo n_5 -STZ. Para ello se le administró una dosis de 90 mg/kg de estreptozotocina en el quinto día después de su nacimiento.

-Medición de glucosa

Las mediciones de glucosa se efectuaron con dos glucómetros; ACCUTREND GC (Roche) y HemoCue 201 Analyzer (Quest Diagnostics), mediante la utilización de sus respectivas tiras reactivas. Las muestras de sangre animal se obtuvieron de la vena caudal.

- Administración de Tratamientos

Una vez calculada la dosis correspondiente para cada rata experimental, los extractos, se suspendieron en solución fisiológica (solución de NaCl 0.9%).

Las dosis se calcularon respecto a la dosis tomada por un humano de 65 kg, y se extrapolaron a una rata experimental de 250g de la siguiente manera.

Calculo dosis para el extracto total de *O. streptacantha*

PESO Kg	DOSIS g	
65	6	
0.25	0.23	
	Dosis calculada	0.1 g/kg
	Dosis administrada	0.1 g/kg (1x)

Calculo dosis para el para el jugo de *O. streptacantha*

PESO Kg	DOSIS mL	
65	35	
0.25	0.15	
	Dosis calculada	0.6 mL/kg
	Dosis administrada	4 mL/kg (6.6x)

La administración de las soluciones se realizó de la siguiente manera:

Primero se administró la acarbosa, o los extractos de *Opuntia* con ayuda de una sonda esofágica que permite asegurar que el tratamiento llegue hasta el tracto digestivo.

Pasados 5 minutos, se administró a las ratas una solución de maltosa, a una dosis de 3 g/kg. A partir de este momento se tomaron los tiempos para las mediciones subsiguientes.

Las mediciones de glucosa de los grupos experimentales se realizaron en los tiempos 0, 30, 60, 90 minutos; donde T_0 indica la media previa a la administración cualquier tratamiento y T_{30} , T_{60} , T_{90} hacen referencia a la toma de muestras minutos después de la administración del tratamiento.

Este método es para determinar el nivel glucosa en sangre, producto del desdoblamiento de la maltosa administrada.

Como control positivo se empleó el fármaco Acarbosa (Glucobay, Bayer), un agente inhibidor de las alfa-Glucosidasas.

Se formaron grupos de 11 individuos y los tratamientos evaluados en el presente trabajo fueron los siguientes:

	Grupo	Dosis
1	Control No Diabético Sol. Fisiológica (-)	4mL/kg
2	Control No Diabético Acarbosa (+)	3 g/kg
3	Control Diabético Sol. Fisiológica (-)	4 mL/kg
4	Control Diabético Acarbosa (+)	3 mg/kg
5	Extracto Total Liofilizado <i>Opuntia streptacantha</i>	100 mg/kg
6	Jugo <i>Opuntia streptacantha</i>	4 mL/kg

Tabla 2. Tratamientos evaluados en la prueba de tolerancia a maltosa.

PURIFICACIÓN DE DISACARASAS DE INTESTINO DE RATA

La purificación de las enzimas del intestino de rata se realizó conforme a la metodología descrita por Nishioka (1998) con modificaciones.

Se disectó el intestino delgado de 6 ratas Wistar sobre una superficie a 4°C; mismo que se lavó dos veces con solución salina 0.9% y una vez más con buffer de fosfato de potasio 0.1 M con EDTA 5 mM, pH 7. Una vez lavado el intestino se raspó la mucosa, la cuál se homogenizó con el mismo buffer de lavado en proporción 3:1 y se centrifugó a 21,000 g por espacio de 60 min.

El precipitado, producto de la centrifugación, se resuspendió con buffer de fosfato de potasio conteniendo 1% de Triton X-100 y se incubó a 4° C por 30 minutos después se centrifugó a 32,000g por 60 min.

Del centrifugado se recuperó el sobrenadante y se colocó en membranas de diálisis contra buffer de fosfato de potasio 0.01M con 1.5 mM de EDTA por 24 horas, cambiando el buffer de diálisis cada 8 horas.

Transcurridas las 24 horas, el contenido de las membranas de diálisis se ultracongeló para su posterior liofilización y almacenamiento.

MODELO DE ENZIMA LIBRE

La inhibición en la actividad de las alfa-Glucosidasas (AGH) se determinó en un sistema de enzima libre de extracto de intestino de rata. La actividad fue determinada de acuerdo al procedimiento descrito por Matsui 1999, con modificaciones.

En buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8, se determina la actividad de la AGH mediante la medición del p-nitrofenol liberado a partir del p-Nitrofenil α -D-glucopiranosido (4-PNPGP).

Para el ensayo se coloca en buffer de fosfatos una solución de extracto de nopal tal que produzca concentraciones finales que van desde 0.2 hasta 20, 000 μ g por mL de ensayo. Cada ensayo tiene una alícuota de AGH para dar una actividad de 0.05 unidades de absorbancia/minuto.

Para iniciar la prueba se adiciona una alícuota de 4-PNPGP tal que genere una concentración final 2 mM de sustrato. El ensayo se lee en el espectrofotómetro modelo Beckman DU640, a 405 nm por 8 minutos, tomando medidas cada 15 segundos.

La actividad de la enzima se determina a partir del Δ absorbancia/minuto en las condiciones antes mencionadas. La cantidad de inhibidor (μ g/mL) necesario para lograr una actividad al 50% es definida como el valor IC_{50} , calculada por método gráfico.

HIDRÓLISIS DE SACAROSA EN INTESTINO EVERTIDO.

El intestino de rata se extrajo y se lavó con solución salina de Krebs-Ringer, pH 7.3, el intestino lavado y disectado fue cortado en tres porciones iguales. Se utilizó la región proximal del segmento más ileal.

El intestino es evertido para que la membrana de borde de cepillo que daba hacia el lumen del intestino, ahora quede hacia el medio experimental.

Porciones de 3 cm de largo se ligan en los extremos y se incuban en solución salina de Krebs-Ringer pH 7.3, con o sin los extractos de nopal, el cuál fue resuspendido en buffer de ensayo y su pH fue ajustado. El extracto de nopal se agregó al medio de ensayo para tener una concentración final de de 20 mg de extracto liofilizado por mililitro de ensayo. Como sustrato de las disacaridasas se utilizó sacarosa a una concentración de 50 mM. Los sacos de intestino fueron incubados 20 minutos a 37°C con oxigenación.

Se tomaron alícuotas al inicio y al final del periodo de incubación para determinar la glucosa. La glucosa liberada se midió con un juego de reactivos para glucosa oxidasa de la marca Spinreact. La diferencia en absorbancia de tiempo inicial y el final se interpretó como la actividad de la sacarasa.

Como la glucosa liberada normalmente sería tomada por el tejido, a la solución de incubación se le adicionó phloridzina, un inhibidor del transportador de glucosa, a una concentración de 0.5 mM, con esto se aseguró que la glucosa producto de la hidrólisis de sacarosa permaneciera en el medio de incubación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Sólo se analizaron estadísticamente los datos de la prueba de tolerancia a maltosa, ya que fue en la única donde se observó actividad de los extractos de nopal. Los datos fueron analizados mediante una prueba de ANOVA, y se aplicó un *post-hoc* de Tukey. Los datos se consideraron significativos con una $p < 0.05$.

RESULTADOS

FITOQUÍMICA

Todos de los extractos utilizados en los modelos *in vitro* e *in vivo* fueron analizados mediante un sistema de HPLC acoplado un detector de arreglo de diodos. Todos los extractos mostraron la misma composición química, conteniendo en un pico correspondiente al compuesto mayoritario con un tiempo de retención de aproximadamente 8 minutos y una zona que va del minuto 12 al 22 (Figura 10, sólo se presenta el cromatograma del extracto total).

De la columna cromatográfica del jugo de nopal se aisló una fracción pura que posteriormente se analizó mediante NMR C^{13} y NMR H^1 . El compuesto fue estructurado por el Dr. Helmut Wiedenfeld, en el Instituto de Farmacia de la Universidad de Bonn, Alemania. El compuesto es el ácido para-hidroxibenciacético (Figura 11).

La comparación de los cromatogramas de los extractos evaluados en el presente trabajo y el del compuesto puro, dio como resultado que el pico del compuesto mayoritario corresponde con rango del 90 al 95 % de similitud al compuesto aislado (Figura 12). Es por esta razón que se decidió evaluar la actividad del compuesto puro en el modelo de enzima libre y probar su inhibición sobre las alfa-Glucosidasas.

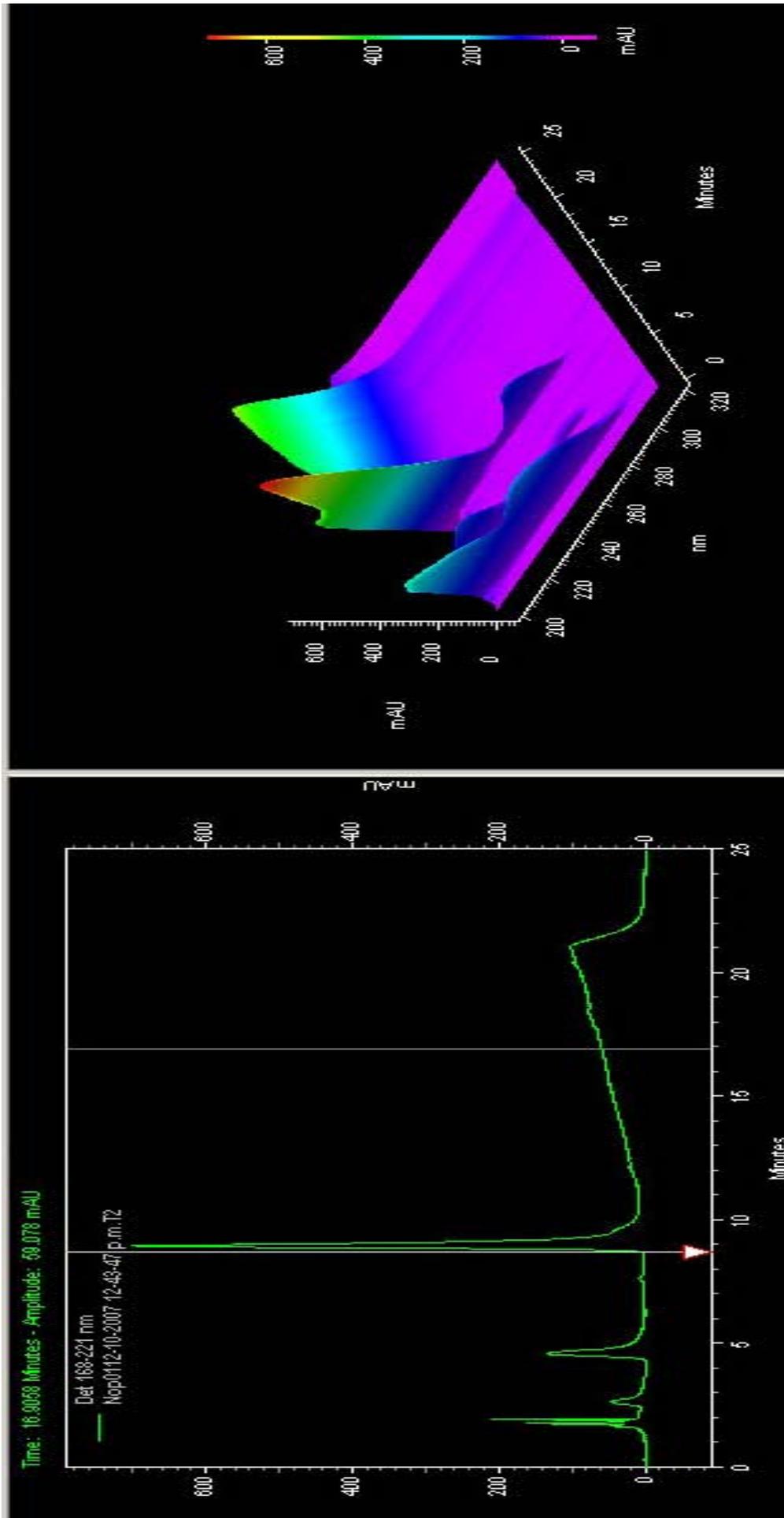


Figura 10. Cromatograma del extracto total de *Opuntia streptacantha*.

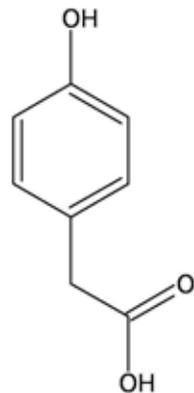


Figura 11. *Ácido para-hidroxi-bencilacético* .
Compuesto aislado de *Opuntia streptacantha*.

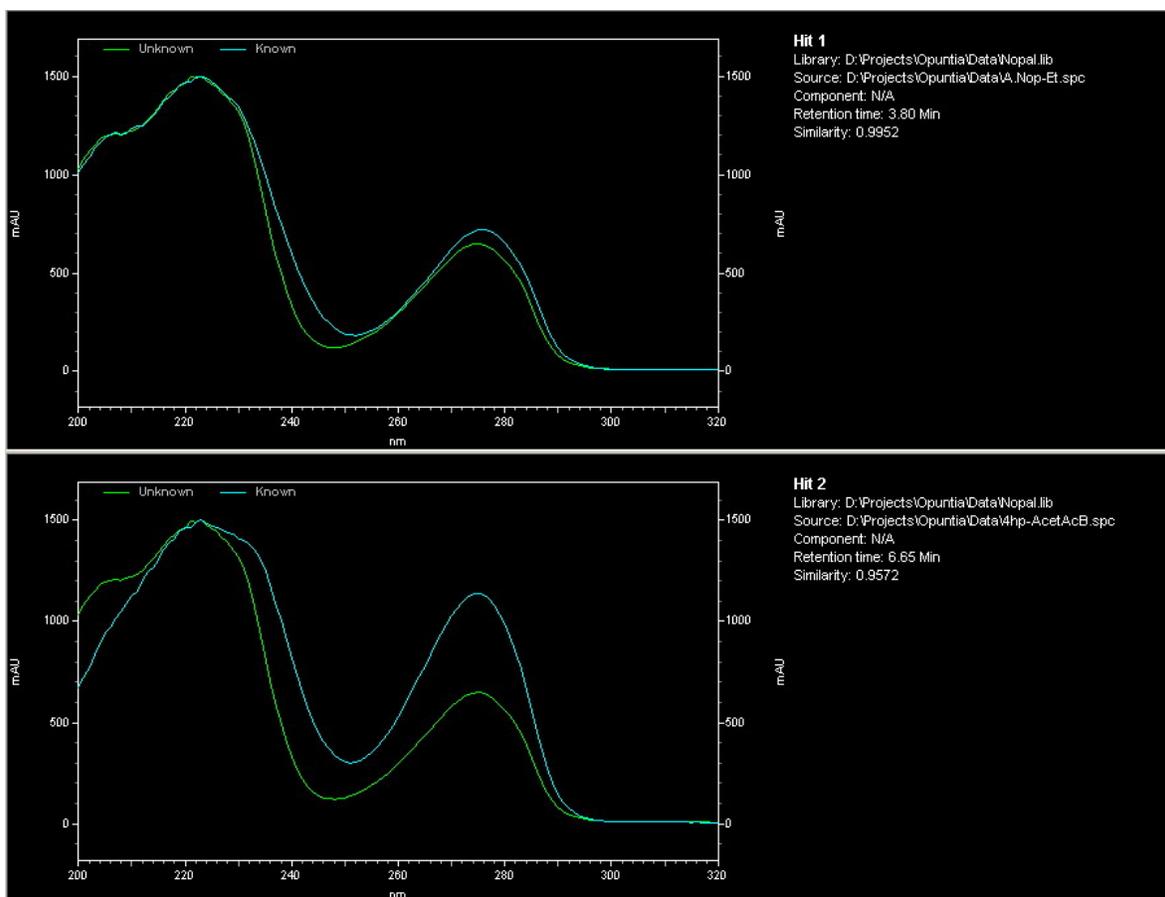


Figura 12. Comparación del ácido para-hidroxi-bencilacético y el compuesto mayoritario en los extractos de *O. streptacantha*.

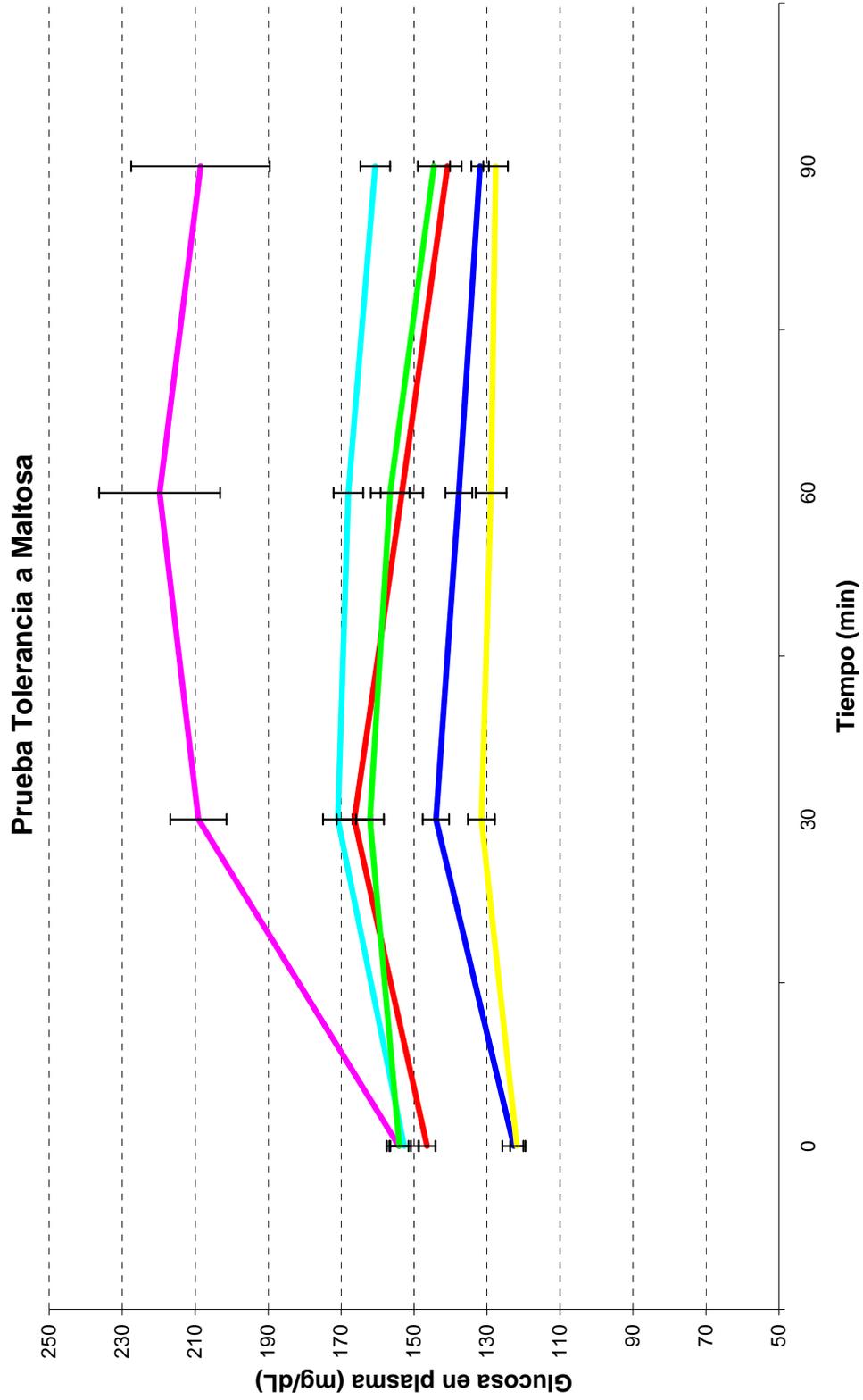
CURVA TOLERANCIA A MALTOSA

Se formaron 6 grupos con 11 animales experimentales cada uno (Tabla 3). Como se observa en la gráfica 1, los dos extractos de *O. streptacantha*, tanto el total como el jugo, presentan diferencias significativas respecto al control diabético al reducir la concentración de glucosa en sangre a partir de los 30 minutos de la administración de maltosa, impidiendo el pico hiperglucémico que se observa en el control diabético tratado con solución fisiológica.

Resulta importante destacar al minuto 90 los extractos de *O. streptacantha* presentan diferencias significativas en comparación con el control diabético con acarbosa.

GRUPO ↓	Glucosa sanguínea [mg/dL]				←TIEMPO
	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	
CONTROL NO DIABÉTICO SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	123±3 ^a	144±4 ^{a,b}	138±4 ^{a,b}	132±2 ^a	CND (-)
CONTROL NO DIABÉTICO ACARBOSA	122±2 ^a	132±4 ^{a,b}	129±4 ^a	128±3 ^a	CND (+)
CONTROL DIABÉTICO SOLUCIÓN FISIOLÓGICA	154±3	209±8 ^b	220±17 ^b	290±19 ^b	CD (-)
CONTROL DIABÉTICO ACARBOSA	153±3	171±4 ^{a,b}	168±5 ^{a,b}	161±5 ^a	CD (+)
Extracto Total <i>Opuntia streptacantha</i>	146±2	166±5 ^{a,b}	153±5 ^a	141±4 ^{a,c}	Ext. Total
Extracto Jugo <i>Opuntia streptacantha</i>	154±3	162±4 ^a	157±5 ^a	145±4 ^{a,c}	Ext. Jugo

Tabla 3. Medias de los valores de glucosa con su error estándar para los diferentes tratamientos. a-muestra diferencias significativas contra el control diabético (-), en el tiempo de la muestra b-muestra diferencias significativas contra T₀ del mismo tratamiento. c-muestra diferencias significativas contra el control diabético (+), en el tiempo de la muestra. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con una p<0.05; n=11.



Grafica 1. Curvas de tolerancia a maltosa, medias \pm error estándar, n=11. —CND(-); —CND(+); —CD(-); —CD(+); —Ext. Total; —Ext. Jugo

MODELO DE ENZIMA LIBRE.

Para el ensayo en modelo de enzima libre se evaluaron 6 diferentes extractos de *O. streptacantha*, el ácido para-hidroxi-bencilacético y el fármaco acarbosa como control positivo:

1. Extracto Acuoso
2. Extracto Acuoso Centrifugado
3. Extracto Acuoso Filtrado
4. Extracto Etanol-Agua
5. Extracto Etanol-Ácido fosfórico
6. Ácido para-hidroxi-bencilacético
7. Acarbosa
8. Extracto Acuoso pH 5

A los extractos evaluados así como al ácido para-hidroxi-bencilacético y la acarbosa, se les ajustó el pH a 6.8 para realizar este ensayo, con la salvedad del extracto en que se especifica que su pH inicial de 5 no fue ajustado.

Como se observa en la gráfica 2, sólo el extracto acuoso de pH 5 y la acarbosa, un inhibidor de la alfa-Glucosidasas presentaron un efecto sobre la actividad de las enzimas en el modelo evaluado. No así los demás extractos, ni el ácido para-hidroxi-bencilacético, compuesto mayoritario en los extractos de nopal.

Los extractos no presentan una inhibición clara aún a concentraciones de 20 g/mL de ensayo. Los puntos graficados son la media aritmética de tres repeticiones para cada punto.

La máxima inhibición de la actividad enzimática observada en los ensayos, fue producida por el extracto de etanol-ácido fosfórico; el cual produjo una inhibición de la actividad del 12% a una concentración de 2 mg/mL de ensayo; efecto que no se mantiene al incrementar la concentración de extracto.

HIDRÓLISIS DE SACAROSA, INTESTINO EVERTIDO

Para el modelo experimental de intestino evertido descrito en el apartado de metodología del presente trabajo, se evaluó una concentración única de 20 mg de extracto total de nopal por mililitro de ensayo, concentración más alta del ensayo de enzima libre.

Cada segmento de intestino fue su propio control, es decir, se evaluó en si mismo la cantidad de sacarosa hidrolizada en presencia y ausencia del extracto total de *O. streptacantha*. La cantidad de glucosa liberada en 20 minutos de ensayo en ausencia del extracto experimental fue referida como el 100 % de actividad, y la glucosa hidrolizada por el segmento de intestino en el medio con el extracto se refirió como una proporción de esa actividad.

El porcentaje de actividad observado en presencia del extracto total de *O. streptacantha* fue de $98 \pm 3 \%$ (n=6), es decir prácticamente no hubo inhibición de la actividad de las alfa-Glucosidasas del epitelio del intestino de rata.

DISCUSIÓN

En la actualidad la utilización del nopal como coadyuvante en la terapia contra la diabetes, se ha extendido a lo largo y ancho del territorio nacional; pero esta generalización en su uso no se encuentra sustentada en datos científicos (Coronado *et al.*, 2004)

El primer estudio que relaciona al nopal con la diabetes mellitus está fechado en 1964 y fue realizado por el IMEPLAN (Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales) (Murray, 2000) y desde entonces no han sido pocos los trabajos que, con estudios preclínicos y clínicos, han aportado datos sobre la actividad tanto antihiper glucemiante como del denominado efecto agudo asociado a un efecto hipoglucemiante que debe ser entendido con reservas.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de *Opuntia streptacantha* sobre la hidrólisis de disacáridos, por ser uno de los mecanismos sobre el que más hipótesis se han planteando en la literatura (Ibáñez, *et al.*, 1979; Frati-Munari *et al.*, 1991; Alarcón *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2000). Para tal propósito se plantearon dos bioensayos *in vitro* para determinar el efecto de *O. streptacantha* como inhibidor de las alfa-Glucosidasas .

En el modelo de enzima libre para evaluar la actividad de *Opuntia* como inhibidor de las alfa-Glucosidasas ninguno de los extractos presentó una actividad inhibitoria, la única actividad encontrada fue dependiente de pH, pero resulta improbable pensar que este efecto encontrado en el modelo experimental sea el que actúe en el animal del modelo *in vivo*, ya que la acidez producida por el jugo del nopal sería neutralizada al llegar al intestino delgado, no teniendo de esta manera un mecanismo de acción producto de la acidificación del intestino proximal.

Como otro experimento que pudiese arrojar luz de la actividad de *O. streptacantha* sobre las disacaridasas del intestino delgado, se analizó la hidrólisis de sacarosa en un modelo fisiológico de intestino evertido; modelo en el que tampoco se encontró actividad del extracto de nopal, aún cuando el extracto probado fue el denominado total, el cual contiene todas las fibras tanto solubles como insolubles, así como el mucílago. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de la sacarasa en presencia del extracto de nopal, lo que indica que el sustrato de la enzima, la sacarosa, aparentemente no es secuestrado por las fibras, ni el mucílago impide físicamente la acción de las alfa-Glucosidasas, como lo han propuesto algunos autores (Fatri-Munari *et al.*, 1983; Laurenz *et al.*, 2003), además si la fibra fuese la responsable del efecto antihiper glucémico, todas las plantas fibrosas presentarían dicha acción, hipótesis que fue evaluada y descartada en un estudio que analizó el efecto de la fibra de calabaza y no encontró la actividad hipoglucemiante (Fрати-Munari *et al.*, 1988).

Resulta importante destacar que en la prueba *in vivo* de curva de tolerancia a maltosa, los dos extractos probados presentan un efecto antihiper glucémico estadísticamente significativo, al impedir el pico hiper glucémico a partir de los 30 minutos de la administración de maltosa en comparación con el control diabético con solución fisiológica. Estos resultados concuerdan con los descritos en la literatura (Fрати-Munari *et al.*, 1989, 1990, 1991; Becerra-Jiménez 2005, Roman-Ramos, 1995) pero los datos obtenidos en el presente trabajo dejan de manifiesto que este efecto “antihiper glucemiante” no es producto de la inhibición de las alfa-Glucosidasas como lo habían especulado estos autores en sus trabajos, ya que el presente trabajo es el primero en seleccionar un modelo experimental que pueda dar respuesta al posible mecanismo de acción del nopal.

Es importante señalar que la digestión de carbohidratos involucra dos eventos independientes, que son la hidrólisis de los oligo y disacáridos y la absorción

celular de los monosacáridos. El presente trabajo se enfocó solamente a uno de estos dos procesos, el de hidrólisis, por ser el evento que es tratado mediante medicamentos (los inhibidores de las alfa-Glucosidasas) en la terapéutica de la diabetes mellitus, además de que en los últimos años la identificación de compuestos de origen botánico con esta propiedad ha sido creciente.

Dentro del proceso de digestión de carbohidratos es necesario estudiar el efecto del nopal sobre la absorción celular de monosacáridos, es decir la acción que puedan tener los diferentes extractos o compuestos puros identificados, sobre los complejos enzimáticos involucrados en la absorción de carbohidratos (SGLT1 y GLUT5).

El aislamiento y estructuración del compuesto mayoritario de *O. streptacantha*, es un paso más en su caracterización fitoquímica, en particular en la composición química de los cladodios por ser éstos los utilizados en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes, y por contar con pocos datos de la fitoquímica de los mismos.

Si bien el ácido para-hidroxi-bencilacético no presentó actividad como inhibidor de las alfa-Glucosidasas, no se descarta que puede tener alguna relación con el efecto antihiper glucémico observado en el modelo *in vivo*. Cabe hacer mención que no debe entenderse ni asumirse que por ser el compuesto mayoritario deba tener actividad farmacológica.

Es necesario seleccionar otro modelo biológico para evaluar el mecanismo de acción de *Opuntia*, así como continuar realizando la caracterización química de los extractos, pues es muy probable que cuando se pueda asignar un mecanismo de acción al nopal; las diferencias, tanto cualitativas como cuantitativas, en composición química resulten significativas.

CONCLUSIONES

- Los extractos de *O. streptacantha* impiden el pico hiperglucémico en una prueba de tolerancia a maltosa.
- La actividad antihiper glucemiante no puede ser atribuida a la inhibición de las alfa-Glucosidasas del epitelio del intestino delgado.
- Los 6 diferentes extractos de *O. streptacantha* no presentan efecto alguno sobre las disacaridasas de intestino de rata, aún a concentraciones de 20 mg/mL de ensayo.
- El ácido para-hidroxi-bencilacético, compuesto mayoritario en los extractos de *O. streptacantha*, no produce inhibición en las disacaridasas de intestino de rata.
- El extracto total de *O. streptacantha*; el cual contiene el mucílago y las fibras, no inhibe la actividad de la sacarasa en un modelo fisiológico de intestino evertido.

PERSPECTIVAS

- Continuar la caracterización fitoquímica de los cladodios de las especies de *Opuntia* que sean consumidas para el tratamiento de la diabetes mellitus.
- Evaluar el efecto de los extractos de *Opuntia* sobre el proceso de absorción celular de carbohidratos.
- Evaluar la actividad de *O. streptacantha* sobre la secreción de insulina.
- Analizar la actividad de *O. streptacantha* como sensibilizador del músculo esquelético a la acción de la insulina

LITERATURA CITADA

- Akcelrad L. 2001. Cactaceae. en Rzedowski GC de, J. Rzedowski (ed). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.
- A.D.A. 2007. "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus". Diabetes Care 30: S42–S47.
- Alarcon-Aguilar FJ, Banderas-Dorantes T, Gutierrez-Leon A, Vazquez-Carrillo L, Flores Saenz JL, Roman-Ramos R.. Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia streptacantha*. Proc West Pharmacol Soc 46: 139-42.
- Andrade Cetto, A. 1999. Estudio etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal & Chalm. Y *Cecropia obtusifolia* Bertol. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. 100 p.
- Andrade-Cetto A y Hienrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J Ethnopharmacol 99: 325-48.
- Argueta A. Ed.1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. INI, México. 3 Tomos.
- Arias-Diaz J , Balibrea J. 2007. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. Nutr Hosp 22:160-68

- Balkan B, Steffens AB, Bruggink JE, Strubbe JH. 1991. Hyperinsulinemia and glucose tolerance in obese rat on food intake and route of administration. *Metabolism* 40:1092-100.
- Becerra Jiménez J. 2005. Estudio sobre el efecto de 5 plantas hipoglucemiantes mexicanas sobre la absorción de glucosa intestinal, en ratas (n-stz) diabéticas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 75 p.
- Bloomgarden ZT. 2008. Approaches to treatment of type 2 diabetes. *Diab Care* 31: 1697-1703.
- Bonnier-Weir S, Trent DE, Honey RN, Weir GC.1981. Response to neonatal islets to streptozotocin: Limited β cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 30, 64-69.
- Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M; STOP-NIDDM Trail Research Group. 2002. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 15: 2072-2077.
- Coronado GD, Thompson B, Tejada S, Godina R. 2004. Attitudes and beliefs among Mexican Americans about type 2 diabetes. *J Health Care Poor Underserved* 15: 576-588.
- Frati-Munari AC, Fernández-Harp JA, de la Riva H, Ariza-Andraca R, del Carmen Torres M. 1983. Effects of nopal (*Opuntia* sp.) on serum lipids, glycemia and body weight. *Arch Invest Med* 14: 117-125.
- Frati-Munari AC, Fernández-Harp JA, Banales-Ham M, Ariza-Andraca CR. 1983. Decreased blood glucose and insulin by nopal (*Opuntia* sp.). *Arch Invest Med* 14: 269-274.

- Frati-Munari AC, Yever-Garces A, Islas-Andrade S, Ariza-Andraca CR, Chavez-Negrete A. 1987. Studies on the mechanism of “hypoglycemic” effect of nopal (*Opuntia* sp.). Arch Invest Med 18: 7-12
- Frati-Munari AC, Rios Gil U, Ariza-Andraca CR, Islas-Andrade S, Chavez-Negrete A. 1988. Effect of various doses of nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) on the glucose tolerance test in healthy individuals. Arch Invest Med 19: 143-148.
- Frati-Munari AC, Altamirano-Bustamante E, Rodríguez-Barcenás N, Ariza-Andraca CR, Lopez-Ledesma R. 1989. Hypoglycemic action of *Opuntia streptacantha* Lemaire: study using raw extracts. Arch Invest Med 20: 321-5.
- Frati-Munari AC, Del Valle-Martinez LM, Ariza-Andraca CR, Islas-Andrade S, Chavez-Negrete A. 1989. Hypoglycemic action of different doses of nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) in patients with type II diabetes mellitus. Arch Invest Med 20: 197-201.
- Frati-Munari AC, Gordillo BE, Altamirano P, Ariza CR, Cortez-Franco R, Chavez-Negrete A. 1990. Acute hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in NIDDM. Diab Care 13: 455-456.
- Frati-Munari AC, Gordillo BE, Altamirano P, Ariza CR, Cortez-Franco R, Chavez-Negrete A, Islas-Andrade S. 1991. Influence of nopal intake upon fasting glycemia in type II diabetics and healthy subjects. Arch Invest Med 22: 51-56.
- Goycoolea FM and Cárdenas A. 2003. Pectins from *Opuntia* spp.: A Short Review. J. PACD 5: 17-29.

- Heinrich, M. 2003. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Curr Top Med Chem* 2:141-54.
- Heinrich M. 2008. Ethnopharmacy and natural product research—Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. *Phytochem Letters* 1: 1-5.
- Holmstedt B and Bruhn Jan G. 1983. Ethnopharmacology-A challenge. *J Ethnopharmacol* 7: 251-256.
- LeDoux SP, Woodley SE, Patton NJ, and Wilson GC. 1986. Mechanims of nitrosurea- induced β cell damage. Alterations in DNA. *Diabetes* 35: 866-872.
- Lee E, Hyoung A, Yun JK, Changbae SS, Kyung-Tae J, Jungsook LC and Yong SL. 2003. Constituents of the Stems and Fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Arch Pharm Res* 26: 1018-1023.
- Matsui T, Oki T, Osajima Y. 1999. Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J Agric Food Chem* 47: 550-553.
- Moller David E. 2001. New drug targets for Type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414: 821-827.
- Murray Guillermo. 2000. El poder curativo del Nopal. Ed. Selector. 160 p.
- Nishioka T, Kawabata J, Aoyama Y. 1998. Baicalein, an alpha-glucosidase inhibitor from *Scutellaria baicalensis*. *J Nat Prod* 61:1413-1415.

- Okamoto H. 1981. Regulation the proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin-dependent diabetes. *Mol Cell Biochem* 37: 43-61.
- Portha B, Picolon L, Rosselin G. 1979. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17: 371-377.
- Puls W and Keup U. 1973. Metabolic studies with an alpha amylase inhibitor (Bay q 7791) on blood glucose, serum insulin and mefa in starch loading test in rat, dogs and man. *Diabetologia* 9: 97-101.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL, Alarcón-Aguilar FJ. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J Ethnopharmacol* 48: 25-32.
- Schultes O. 1991. Historical perspective and future of ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol* 32: 7-24.
- Shiruzi JA, Sarvetnick N. 1991. Transgenic mice for the study of diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2: 97-104.
- Soumyanath Amadala. 2006. *Tradicional Medicines for Modern Times Antidiabetic Plants*. Taylor and Francis group. Boca Raton Florida, EU. 314 p.
- Stojanovska L, Rosella G, Proietto J. 1990. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol* 258: E748-E756.
- Trejo-Gonzalez A, Gabriel-Ortiz G, Puebla-Perez AM, Huizar-Contreras MD, Munguia-Mazariegos MR, Mejia-Arreguin S, Calva E. 1996. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol* 55: 27-33.

- Toeller M. 1994. Alpha-Glucosidase Inhibitors in diabetes: Efficacy in NIDDM Subjects. *Eur J Clin Invest* 24: 31-35.
- Wehmeier UF and Piepersberg W. 2004. Biotechnology and molecular biology of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 613–625.
- WHO. 2006. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of WHO/IDE consultation. 50 p.
- Zhao G, Zhang X, Smith CJ, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D. 1999. Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol* 277: H268-H278