



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de raíz de tejocote *Crataegus mexicana* en ratones CD1

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
PRESENTA**

**MARIBEL OLVERA GARCÍA**

**ASESOR: MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL**

**DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA**

Laboratorio 1 PA- UMIEZ, FES Zaragoza Campus II

Agradecimiento al Proyecto PAPIME PE203613



**FES  
ZARAGOZA**

MÉXICO, D.F. MARZO 2014



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.

# *Dedicatorias*

*A mi Ximena, por ser parte importante de este proyecto de principio a fin, ser ahora mi principal motivación y la luz en mi vida.*

*A Eduardo por ser ya parte de mi vida, principal apoyo en todas mis decisiones, por los buenos, malos y mejores momentos y sobre todo... por su amor.*

*A mis padres María Luisa y Pablo, por el apoyo incondicional y su amor, muy a pesar de las decisiones que tome, por no dejarme sola.*

*A mis hermanos María Guadalupe y Sergio, porque me han enseñado, las mejores lecciones de la vida, que nunca estaré sola y que siempre contaré con ellos.*

*A mis amigos, Q.F.B. Marisela, Rebeca, Gabriela B, José A, Juan Carlos, Casandra, Karla y Hugo, Berenice, Vanessa, Gino, Luis, Alberto, por los mejores momentos que eh vivido y porque mi estancia en la Facultad no hubiese sido la misma sin ellos, sobre todo por su amistad y por no dejarme sola en los momentos más importantes de mi vida.*

# *Agradecimientos*

*A ti Señor, por permitirme continuar y concluir esta meta.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me dio de pertenecer a ella, para continuar con mi formación profesional.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mi casa, en la que aprendí lecciones de vida, que me hicieron una mejor persona y profesionista.*

*A la Maestra Abigail Aguilar Contreras del Herbario del IMSS de Centro Médico Siglo XXI, por realizar la autenticación de la planta utilizada en este proyecto.*

*Al Dr. Rubén, mi director de tesis, por la oportunidad de conocerlo y la confianza; por ser mi profesor; asignarme un proyecto y proporcionarme los recursos necesarios para elaborarlo. Por sus anécdotas, que hicieron de mi estancia en el laboratorio una experiencia inolvidable.*

*Al profe Maurilio, mi asesor en el proyecto, por su tiempo, apoyo, y consejos antes, durante y después de realizar el proyecto.*

*A mi revisora de tesis Dra. Ma. Teresa Corona Ortega, sinodal M. en C. Ma. Teresa G. Fuentes Lara y sinodal Q.F.B. Lilia Tequianes Bravo, por el tiempo invertido en revisar mi trabajo y ayudarme a mejorarlo.*

*A mis profesores. Dr. Luis Alfredo, Q.F.B. Yolanda, Q.F.B. Armando, que me apoyaron explicando conceptos o actividades que no quedaban claras; a mis compañeros Raúl, Luis, Haidee, Gerardo, Jesús, que me ayudaron y apoyaron, o simplemente hicieron más divertida la estancia en el laboratorio.*

*A mis maestros, amigos y colegas Q.F.B. Carlos M y Q.F.B. Edgar C, por las clases, el apoyo, la motivación y los consejos que me ayudaron a no rendirme jamás.*

*A mis amigas, Históloga Verónica G. y Dra. Leticia P. por sus consejos, motivación y por su gran amistad.*

---

**Índice**

1.	Resumen .....	1
2.	Introducción.....	2
3.	Marco teórico.....	4
3.1	<i>Crataegus mexicana</i> .....	4
3.1.1	Origen y distribución .....	4
3.1.2	Usos .....	5
3.1.3	Tratamiento complementario de la Diabetes Mellitus tipo 2. ....	6
3.1.4	<i>Crataegus mexicana</i> para disminuir peso.....	7
3.2	Diabetes Mellitus.....	8
3.2.1	Definición.....	8
3.2.2	Clasificación .....	8
3.2.2.1	Diabetes Mellitus tipo 1 .....	8
3.2.2.2	Diabetes Mellitus tipo 2 .....	8
3.2.2.3	Diabetes gestacional .....	9
3.2.3	Manifestaciones clínicas.....	9
3.2.3.1	Complicaciones agudas .....	9
3.2.3.1.1	Hiperglucemia .....	9
3.2.3.1.2	Cetoacidosis diabética .....	9
3.2.3.1.3	Coma hiperosmolar .....	10

3.2.3.1.4 Hipoglucemia .....	11
3.2.3.2 Complicaciones crónicas.....	12
3.2.3.2.1 Enfermedad micro vascular.....	12
3.2.3.2.1.1 Retinopatía diabética .....	12
3.2.3.2.1.2 Nefropatía .....	13
3.2.3.2.1.3 Neuropatía .....	14
3.2.3.2.2 Enfermedad macrovascular .....	15
3.2.3.2.2.1 Hipertensión.....	15
3.2.3.2.2.2 Hipertrigliceridemia .....	15
3.2.3.2.3 Úlceras e infección.....	16
3.2.4 Tratamiento .....	17
3.2.4.1 Sulfonilureas.....	17
3.2.4.1.1 Tolbutamida .....	17
3.2.4.1.2 Glibenclamida .....	18
3.2.4.2 Biguanidas.....	18
3.2.4.3 Tiazolidinedionas.....	18
3.2.4.4 Inhibidores de $\alpha$ glucosidasas.....	18
3.3 Páncreas.....	19
3.3.1 Síntesis de insulina.....	19
3.3.2 Regulación de la secreción.....	20

3.3.3 Mecanismo de acción .....	21
3.3.4 Funciones de la insulina .....	21
3.3.5 Glucagon .....	22
3.3.6 Somatostatina.....	23
3.4 Hígado .....	24
3.4.1 Ceruloplasmina.....	24
3.5 Modelo experimental.....	26
3.5.1 Ratón ICR: CD1 .....	26
3.6 Toxicidad.....	27
3.6.1 Toxicidad aguda .....	27
3.6.2 Pruebas sub agudas.....	28
3.6.3 Pruebas sub crónicas .....	28
3.6.4 Pruebas crónicas .....	28
3.7 Óxido nítrico.....	29
4. Planteamiento del problema.....	30
5. Objetivos .....	31
5.1 Objetivos generales .....	31
5.2 Objetivos específicos .....	31
6. Hipótesis .....	32
7. Diseño experimental.....	33

7.1 Tipo de estudio .....	33
7.2 Población de estudio.....	33
7.3 Criterios de inclusión.....	33
7.4 Criterios de exclusión.....	33
7.5 Criterios de eliminación.....	33
7.6 Variables dependientes .....	33
7.7 Variables independientes.....	33
8. Material y método.....	34
8.1 Colección de la planta <i>Crataegus mexicana</i> .....	36
8.1.1 Tipificación de la planta .....	36
8.1.2 Obtención del extracto de raíz de tejocote .....	36
8.2 Preparación de soluciones del extracto <i>Crataegus mexicana</i> .....	36
8.3 Preparación de soluciones para efecto hipoglucemiante.....	37
8.4 Efecto hipoglucemiante.....	38
8.5 Obtención de órganos.....	39
8.6 Análisis de nitritos .....	39
8.6.1 Activación del cadmio.....	39
8.6.2 Preparación de las muestras.....	40
8.7 Ceruloplasmina .....	41
8.8 Análisis estadístico .....	42



9.	Resultados .....	43
9.1	Ensayo de toxicidad.....	43
9.1.1	Disminución de peso .....	45
9.2	Índices de órganos.....	45
9.3	Ceruloplasmina .....	46
9.4	Nitritos.....	46
9.5	Efecto hipoglucemiante.....	47
10.	Discusión de resultados .....	50
11.	Conclusiones.....	54
12.	Bibliografía .....	55

## ABREVIATURAS

DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo1
DM2	Diabetes Mellitus tipo2
Na <sup>+</sup>	Ión sodio
K <sup>+</sup>	Ión potasio
mosm/L	miliosmoles/Litro
mg/dL	miligramos/decilitro
SNC	Sistema Nervioso Central
mg	Miligramos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
kD	kiloDalton
ATP	Trifosfato de Adenosina
GLUT-2	Transportador 2 de glucosa
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
IRS	Sustratos Receptores de Insulina
Cu <sup>+</sup>	Ión cuproso
Cu <sup>2+</sup>	Ion cúprico
ICR	Institute of Cancer Research
CRL	Charles River Laboratories
LD <sub>50</sub>	Dosis Letal <sub>50</sub>
LOAEL	Lowest observable adverse effect level
NOAEL	No observed adverse effect level
g	Gramos
mL	mililitros
°C	Grados Celsius
μL	microlitros
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinc
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre

HCl	Ácido clorhídrico
$\text{Cd}(\text{OH})_2$	Hidróxido de cadmio
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Cloruro de amonio
$\mu\text{g}/\text{mL}$	microgramos/ mililitro
NED	N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
$H_0$	Hipótesis nula
$H_a$	Hipótesis alterna

## 1. Resumen

El objetivo principal de este trabajo, fue la evaluación del extracto etanólico de la raíz de tejocote, *Crataegus mexicana*, utilizado por algunas personas como hipoglucemiante. Se utilizaron 36 ratones divididos en grupos de 6, el primero conformado por control negativo que fue solución salina; tres grupos con dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg de peso, respectivamente y dos controles positivos utilizando Glibenclamida 0.8 mg/Kg y Tolbutamida 40 mg/Kg de peso. Los extractos, fármacos y solución salina se administraron vía oral con sonda gástrica después de medir glucosa basal, de la punta de la cola del ratón, a tiempo 0. Se indujo hiperglucemia temporal mediante la administración subcutánea de glucosa 50% diluida 1:10 y administrada a dosis de 2 g/Kg de peso, a tiempo 0 y después a 60 minutos. Se midió glucosa cada 60 minutos por 4 horas.

Además de evaluar el efecto hipoglucemiante se evaluaron posibles efectos adversos y disminución de peso, realizando la administración del extracto, vía oral con sonda gástrica, durante 21 días, se colectaron muestras de sangre, se separó el suero para realizar pruebas de ceruloplasmina y nitritos. También se diseccionaron órganos: corazón, hígado, riñones y bazo, para observar sus características macroscópicas, se determinaron índices peso órgano/peso ratón para confirmar daño en algún órgano. Se realizó el análisis estadístico de los datos y para nitritos, ceruloplasmina, índices de órganos y disminución de peso, no se encontraron diferencias significativas, para grupos de tratamiento y de control. El extracto a 100 mg/Kg, causó efectos adversos; provocó íleo paralítico en 2 ratones causando su muerte, y en un ratón de 50 mg/Kg, provocó el íleo paralítico temporal puesto que el ratón se recuperó 14 horas después. En la evaluación del efecto hipoglucémico se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa a partir del minuto 60 y hasta el minuto 180; el extracto a dosis de 100 mg/Kg ejerció un efecto rápido pero no fue prolongado, el extracto a dosis de 50 mg/Kg tuvo un efecto hipoglucémico mantenido a lo largo del ensayo y finalmente a dosis de 25mg/Kg el efecto hipoglucémico se prolongó pero fue muy lento para bajar los niveles de glucosa desde el inicio del ensayo.

Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de raíz de tejocote  
*Crataegus mexicana* en ratones CD1.

## 2. Introducción

La Diabetes Mellitus (DM) es un síndrome que afecta cada vez a más personas de todos los países en el mundo. La clasificación de acuerdo a la NOM-015-SSA2-2010<sup>1</sup> se refiere principalmente a Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) o insulino dependiente, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) o no insulino dependiente y Diabetes gestacional. En México son limitados los datos basados en experiencias de pacientes diabéticos que practican el uso de plantas con o sin tratamiento farmacológico, generalmente este tipo de pacientes son diagnosticados con DM2. Algunos de estos pacientes, buscan otras opciones que sustituyan los medicamentos, utilizando plantas medicinales, con lo cual llegan a producir severas complicaciones llegando a la hospitalización.<sup>2</sup>

Si bien el tratamiento de plantas para tratar algunos padecimientos data ya de algunos años, el uso de la especie *Crataegus mexicana* para tratar DM2, es referida en algunos artículos pero su conocimiento acerca de la toxicidad que presenta aun no se ha estudiado a detalle.<sup>3</sup>

El presente trabajo tiene como finalidad la evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de la raíz de tejocote *Crataegus mexicana*, en ratones con hiperglucemia temporal; ya que la raíz de tejocote suele ser empleada por algunos pacientes con DM2 como tratamiento complementario para estabilizar sus niveles de glucosa.

También se pretende evaluar los posibles efectos adversos después de la administración oral a determinado periodo de tiempo, al observar daño en algún

órgano y alteración en el comportamiento de los ratones si se llegaran a presentar y poderlo documentar.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 *Crataegus mexicana*

*Crataegus mexicana* antes denominada *Crataegus pubescens*, es conocida comúnmente como tejocote, manzanillo, manzanilla, chisté, espino blanco<sup>4</sup> siendo su clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Maloidae

Género: *Crataegus*

Especie: *mexicana*<sup>5,6</sup>



Fig.3.1aFruto de *Crataegus mexicana* Fig.3.1b Árbol de *Crataegus mexicana*

##### 3.1.1 Origen y distribución

*Crataegus mexicana* es nativa de México. Es posible encontrarla desde México hasta Centroamérica incluyendo al Ecuador. En México se encuentra de San Luis Potosí a Jalisco, en Veracruz y Chiapas, a una altitud de 1,200 a 3,000 m. En Tlaxcala se le encuentra en barrancas, linderos de terrenos y cultivada en huertos familiares sobre todo en el Parque Nacional La Malintzi, Valle de Tlaxcala y sierra de Tlaxco.<sup>4</sup>

Esta especie de las montañas de México alcanza 4,5-9m de alto, es un árbol espinoso; sus hojas están toscamente dentadas y son de color verde oscuro con el envés velloso. Produce racimos de flores blancas con estambres rosas a mediados de la primavera, seguidos en otoño de grandes frutos comestibles<sup>7</sup> de color amarillo-anaranjado como pequeñas manzanas, sus semillas son lisas y de color café.<sup>8</sup>

### 3.1.2 Usos

De la especie *Crataegus mexicana* se emplean la raíz, ramas, hojas, fruto y flores como remedios herbolarios; estos contienen flavonoides, glúcidos, ácidos orgánicos, pectinas, resinas y taninos. El fruto hervido suele ser empleado para tratar algunas enfermedades respiratorias como la tos, pulmonía, bronquitis y resfriado. También es útil en algunas enfermedades del aparato digestivo como diarrea, amibas, dolor de estómago y en casos de disentería; donde se utiliza la cocción de las hojas y la corteza, administrada por vía oral.<sup>8</sup>

La cocción de hojas también se prescribe para adelgazar, mejorar la circulación coronaria, moderar las contracciones del corazón en caso de taquicardia, como diurético y antiespasmódico. Además, la raíz se usa como antidiabética, en cocción, machacada y remojada en alcohol.<sup>8</sup>

En algunas otras especies de *Crataegus sp*, se han encontrado concentraciones altas de flavonoides, a las que se refiere como los principales compuestos capaces de ejercer algún efecto terapéutico distinto a efecto hipoglucemiante. Se describen efectos antioxidantes,<sup>9,10</sup> reducción de los problemas cardiovasculares<sup>11</sup> y como hipotensivo<sup>11</sup> capaz de disminuir la presión sistólica y diastólica.



### 3.1.3 Tratamiento complementario de la Diabetes Mellitus tipo 2.

Alrededor de 1200 plantas han sido utilizadas en el tratamiento complementario de la DM2 de los cuales, poco más de la mitad han demostrado su efecto hipoglucemiante mediante estudios farmacológicos; se ha determinado también el mecanismo de acción, efectos tóxicos, cuáles son sus compuestos activos y parte de la planta que muestra un mejor efecto. Desafortunadamente no todas estas plantas pueden ser usadas para el tratamiento de DM2 puesto que, un 30% de todas estas plantas se reportan como tóxicas, *Crataegus mexicana* es usada para el tratamiento pero no se reporta que parte de la planta se usa, en que dosis y su toxicidad esta aun en duda.<sup>3</sup>

De una recopilación de artículos publicados en México se encontraron 306 especies de plantas agrupadas, la mayor parte de ellas, en 6 familias; *Crataegus mexicana* no está incluida dentro de esas 6 familias y aunque la raíz en infusión se enlista como planta mexicana con efecto hipoglucémico, no hay descripción de algún ensayo realizado para comprobar ese efecto.<sup>2</sup>

Ahora bien, debido a que el uso de plantas no está restringido, y el uso de éstas queda a criterio de cada persona, en el estado de Morelos de un total de 259 personas encuestadas un porcentaje de 65.6% usan plantas medicinales, siendo recomendadas por un amigo o por personas que se dicen conocedoras de remedios herbolarios. En la mayoría de los casos se usa nopal, prodigiosa y tronadora como hipoglucemiantes, además de que se considera el uso de la raíz de tejocote en infusión como tratamiento para DM2, más sólo un paciente reporta su uso.<sup>13</sup>

### **3.1.4 *Crataegus mexicana* para disminuir peso.**

En nuestro país son muy comercializados productos para bajar de peso, con venta libre al público. De 40 productos analizados, en forma de polvos, comprimidos o cápsulas, se dan a conocer 75 especies de plantas que son usadas para bajar de peso “de manera rápida y segura”. Entre algunas de estas se encuentra a *Crataegus mexicana*.<sup>14</sup> También hay combinaciones de extracto de raíz de nopal, raíz de lima, raíz de tejocote, hojas de limón, pingüica en té que es usado para adelgazar.<sup>15</sup> Y cápsulas que ayudan a reducir el peso, cuyo contenido es la raíz de tejocote, raíz de lima, malabar, hoja de pingüica, zacate de limón, tlaíchamin.<sup>16</sup>

## **3.2 Diabetes Mellitus**

La Diabetes Mellitus (DM) ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, en México, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales.<sup>1</sup>

### **3.2.1 Definición**

Se denomina diabetes a la enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. Se consideran como síntomas clásicos de la diabetes, a la poliuria (micciones frecuentes), la polidipsia (sed constante), la polifagia (hambre) y la pérdida de peso.<sup>1</sup>

### **3.2.2 Clasificación**

#### **3.2.2.1 Diabetes Mellitus tipo 1**

(DM1) Es el tipo de diabetes en la que existe destrucción de células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, casi siempre delgados y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad.<sup>1</sup>

#### **3.2.2.2 Diabetes Mellitus tipo 2**

(DM2) Tipo de diabetes en la que se presenta resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia en su producción, puede ser absoluta o relativa. Los

pacientes suelen ser mayores de 30 años cuando se hace el diagnóstico, son obesos y presentan relativamente pocos síntomas clásicos.<sup>1</sup>

### **3.2.2.3 Diabetes gestacional**

Es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, ésta traduce una insuficiente adaptación a la insulinoresistencia que se produce en la gestante.<sup>1</sup>

### **3.2.3 Manifestaciones clínicas**

#### **3.2.3.1 Complicaciones agudas**

##### **3.2.3.1.1 Hiperglucemia**

Cuando las cifras altas de glucosa exceden el umbral renal para resorción de glucosa sobreviene glucosuria (glucosa en orina). Esto causa una diuresis osmótica que se manifiesta por poliuria, incluso nicturia. Hay deshidratación, lo que estimula la sed que suscita polidipsia. La glucosuria puede producir una pérdida importante de calorías y también de peso. La hiperglucemia que no se controla se acompaña de polifagia. Las tres “poli” de la diabetes-poliuria, polidipsia, polifagia- son síntomas de presentación frecuentes tanto en pacientes con DM1 como en aquellos con DM2 sintomáticos.

Las concentraciones altas de glucosa aumentan la osmolaridad plasmática y los cambios en el contenido de agua del cristalino pueden provocar visión borrosa.<sup>17</sup>

##### **3.2.3.1.2 Cetoacidosis diabética**

Una pérdida profunda de la actividad de la insulina lleva no solo al aumento de las cifras séricas de glucosa debido al incremento de la producción hepática de glucosa y decremento de la captación de glucosa por tejidos sensibles a insulina, sino también a cetogénesis. En ausencia de insulina, se estimula la lipólisis, lo que

proporciona ácidos grasos que se convierten en cuerpos cetónicos en el hígado por acción del glucagon. En diabéticos con DM1 suceden hiperglucemia y cetoacidosis profunda; en la DM2 también puede ocurrir, en especial durante infecciones, traumatismo grave, u otras causas que aumenten el estrés y con ello la concentración de hormonas contrarreguladoras que inhiben la acción de la insulina.

El incremento de la cetogénesis originado por la falta de acción de la insulina causa concentraciones séricas aumentadas de cetonas y cetonuria (cetonas en orina). El acetoacetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato, son los principales cuerpos cetónicos producidos por el hígado, son ácidos orgánicos que suscitan acidosis metabólica, lo cual reduce el pH de la sangre y el bicarbonato sérico. Se estimula la respiración, lo que compensa en parte la acidosis metabólica al disminuir la presión de dióxido de carbono ( $PCO_2$ ). Aunque la cetona es producto menor de la cetogénesis, su olor a fruta puede detectarse en el aliento durante la cetoacidosis diabética.<sup>17</sup>

La cetoacidosis diabética suele acompañarse de náuseas y vómitos, lo que contribuye a deshidratación adicional. Además del agua se pierde sodio ( $Na^+$ ), las reservas corporales totales de potasio ( $K^+$ ) también se reducen por la diuresis y los vómitos y en algunos casos fosfato; que se reemplazan con agua, electrolitos ( $Na^+$  y  $K^+$ ) y administración de insulina.<sup>17</sup>

#### **3.2.3.1.3 Coma hiperosmolar**

En DM2 pueden ocurrir estados hiperosmolares graves en ausencia de cetoacidosis. Estos episodios se precipitan por reducción en la ingesta de líquido,

como ocurre en pacientes de edad avanzada que carecen de suficiente acceso a líquidos (agua) y tienen función renal anormal que obstaculiza la depuración de carga de glucosa excesiva. La deshidratación profunda sucede en respuesta al aumento notorio de la osmolaridad plasmática. Una pérdida grave del líquido intracelular en el cerebro lleva a coma; este último ocurre cuando la osmolaridad plasmática efectiva alcanza 340 mosm/L (normal: 280 a 295 mosm/L).

Debido a que no presentan cetoacidosis y sus síntomas, los pacientes se presentan en etapas más avanzadas cuando ya hay hiperglucemia y deshidratación más profundas; las concentraciones de glucosa van de 800 a 2400 mg/dL, por consiguiente la osmolaridad efectiva excede los 340 mosm/L, lo que da lugar a una incidencia más alta de coma.<sup>17</sup>

#### **3.2.3.1.4 Hipoglucemia**

La hipoglucemia es una complicación del tratamiento con insulina tanto en la DM1 como DM2, pero también puede suceder con hipoglucemiantes orales que estimulan la secreción de la insulina. La hipoglucemia a menudo ocurre durante el ejercicio o con el ayuno. Las concentraciones bajas de insulina promueven la movilización de sustratos de combustibles mediada por hormona contrarreguladora, aumento de la producción hepática de la glucosa e inhibición del procesamiento de glucosa en tejidos sensibles a insulina.

Los síntomas iniciales de hipoglucemia suceden como consecuencia de liberación de catecolaminas (temblor, sudoración, palpitaciones). A medida que la glucosa disminuye más, también ocurren síntomas neuroglucopénicos, por los efectos directos sobre la función del Sistema Nervioso Central (SNC (confusión, coma). Un grupo característico de síntomas (sudores nocturnos, pesadillas, cefalalgias

matutinas) también acompaña a episodios de hipoglucemia que suceden durante el sueño (hipoglucemia nocturna).<sup>17</sup>

### **3.2.3.2 Complicaciones crónicas**

Con el tiempo, la diabetes origina daño y disfunción en múltiples sistemas. La enfermedad vascular es una causa importante de muchas de las secuelas de esta enfermedad. Tanto en la enfermedad micro vascular (retinopatía, nefropatía, neuropatía), como la enfermedad macro vascular (arteriopatía coronaria, vasculopatía periférica), contribuyen a la morbilidad y mortalidad altas que se vinculan con esta enfermedad.<sup>17</sup>

#### **3.2.3.2.1 Enfermedad micro vascular**

##### **3.2.3.2.1.1 Retinopatía diabética**

La DM es la causa principal de ceguera entre adultos, la retinopatía diabética está presente después de los 20 años en personas con DM1 y en menor frecuencia en aquellas con DM2, ocurre en dos etapas no proliferativa y proliferativa.

La retinopatía no proliferativa suele suceder en las DM1 y DM2. Los microaneurismas de los capilares retinianos, que aparecen como manchas pequeñas de color rojo, son el signo más temprano detectable (retinopatía de fondo). La grasa que ha escapado desde las paredes capilares muy permeables aparecen como manchas brillantes de color amarillo con bordes bien definidos (exudados duros), formando un anillo alrededor del área de fuga. La aparición de exudados duros en el área de la macula a menudo se relaciona con edema macular, que es la causa más frecuente de deterioro visual. Conforme progresa la retinopatía los signos de isquemia, en retinopatía de fondo, empeoran (etapa preproliferativa). La oclusión de capilares y de arteriolas terminales causa áreas de

isquemia retiniana que aparecen como áreas de color amarillo nebulosas, con bordes poco definidos (manchas de algodón en rama o exudados blandos) en áreas de infarto. Puede ocurrir hemorragia retiniana y las venas retinianas presentan dilatación segmentaria.<sup>17</sup>

La retinopatía puede progresar a una segunda etapa más grave, caracterizada por la proliferación de vasos nuevos (retinopatía proliferativa). La neovascularización es mas prevaleciente en la DM1 que en la DM2 y es una causa importante de ceguera.<sup>17</sup> La isquemia retiniana estimula la liberación de factores de crecimiento, que provocan la formación de nuevos vasos, lo que puede condicionar hemorragias masivas<sup>1</sup> aunque los capilares sean normales. La tracción entre las nuevas redes fibrovasculares y el vítreo que llevan a hemorragia vítrea o desprendimiento de retina, son dos causas potenciales de ceguera.<sup>17</sup>

#### **3.2.3.2.1.2 Nefropatía**

La nefropatía diabética se produce sobre todo por función glomerular alterada. Los cambios histológicos en DM1 y DM2 son indistinguibles en los glomérulos. Las membranas basales de los capilares glomerulares están engrosadas y pueden obstruir los vasos, el mesangio (tejido de sostén) que rodea los vasos glomerulares esta incrementado por el depósito de material parecido a la membrana basal, y pueden ejercer presión sobre los vasos glomerulares; las arterias glomerulares aferente y eferente también están esclerosadas.<sup>17</sup>

En etapas tempranas de la evolución de la enfermedad existe microalbuminuria, (una pérdida de albumina en la orina) que no puede detectarse mediante un examen de orina con tira sumergible.



Si las lesiones glomerulares empeoran, la proteinuria se incrementa y aparece nefropatía manifiesta. La nefropatía diabética se define por la presencia de más de 300 mg de proteína por día, la proteinuria aumenta a medida que la función renal se reduce. La presencia de hipertensión acelera el proceso, los pacientes con DM2 a menudo ya tienen hipertensión en el momento del diagnóstico; los pacientes con DM1 no presentan hipertensión sino hasta después del inicio de la nefropatía.<sup>17</sup>

### **3.2.3.2.1.3 Neuropatía**

Se define como la neuropatía somática que afecta los nervios sensitivos y motores voluntarios y puede corresponder a un daño difuso (polineuropatía) o localizado en un nervio (mononeuropatía). La neuropatía autonómica (visceral) se manifiesta por diarrea, gastroparesia, vejiga neurogénica, disfunción eréctil e hipotensión ortostática, entre otras complicaciones.<sup>1</sup>

Polineuropatía distal simétrica, la desmineralización de nervios periféricos, afecta sobre todo nervios distales por lo general se manifiesta por pérdida sensorial simétrica en la parte distal de las extremidades inferiores que va precedida por entumecimiento, hormigueo y parestesias. Estos síntomas que avanzan en dirección proximal también pueden ocurrir en manos.<sup>17</sup>

Neuropatía autonómica, suele acompañar a la neuropatía periférica simétrica, puede afectar todos los aspectos del sistema nervioso autónomo, de manera más notoria los que incluyen sistema cardiovascular, genitourinario y gastrointestinal.<sup>17</sup>

Mononeuropatía y mononeuropatía múltiple, el inicio repentino, por lo general doloroso, de pérdida motora en pares craneales o nervios periféricos aislados (mononeuropatía) o en nervios aislados múltiples (mononeuropatía múltiple). Se

creo que la oclusión vascular y la isquemia tienen una función fundamental en la patogenia de estas neuropatías focales asimétricas que por lo regular son de duración limitada y ocurren con mayor frecuencia en la DM 2. <sup>17</sup>

### **3.2.3.2.2 Enfermedad macrovascular**

La enfermedad macrovascular aterosclerótica ocurre con frecuencia aumentada y da lugar a la incidencia de infartos de miocardio, apoplejía y gangrena de las extremidades inferiores.

#### **3.2.3.2.2.1 Hipertensión**

Sucedo con frecuencia aumentada en las DM1 y DM2, y se relaciona con el incremento del contenido de Na<sup>+</sup> extracelular corporal, originando expansión de volumen y supresión de renina. En DM1 la hipertensión ocurre después del inicio de la nefropatía, cuando la insuficiencia renal altera la capacidad para excretar agua y solutos. En la DM2 la hipertensión está presente en el momento del diagnóstico, en individuos de mayor edad, obesos o con resistencia a la insulina. <sup>17</sup>

#### **3.2.3.2.2.2 Hipertrigliceridemia**

La principal anormalidad de lípidos en las DM1 y DM2 mal controladas, es la hipertrigliceridemia y que se debe a un aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) también suelen estar elevadas y disminuido el nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las concentraciones de VLDL están aumentadas debido a la acción insuficiente de la insulina en el tejido adiposo. La hipertrigliceridemia, el colesterol HDL bajo, y el colesterol LDL alto son factores de riesgo para aterosclerosis. El tratamiento con insulina corrige anormalidades de lipoproteínas en la DM1. En contraste, el tratamiento de la hiperglucemia por lo regular no normaliza perfiles de lípidos en

individuos con DM2, resistentes a insulina, obesos, a menos que se acompañe con reducción de peso.<sup>17</sup>

### **3.2.3.2.3 Úlceras e infección**

Las úlceras ocurren en 15% de los diabéticos y llegan a ocasionar amputaciones. Las úlceras llegan a producirse por lesiones insensibles debido a polineuropatía simétrica, debidas a que la sensación de vibración o presión en el pie esta disminuida o la falta de reflejos en el tobillo; por enfermedad macrovascular o microvascular o por infecciones causadas por alteraciones de la función de neutrófilos e insuficiencia vascular.

Las infecciones llegan a presentarse porque la quimiotaxis de neutrófilos y la fagocitosis son defectuosas en la DM mal controlada. La inmunidad mediada por células también puede ser anormal. Más aún las lesiones vasculares pueden obstaculizar el flujo sanguíneo, lo que impide que las células inflamatorias lleguen a heridas u otros posibles sitios de infección. Las infecciones producidas por *Candida albicans*, enfermedad periodontal llegan a ser las más frecuentes en pacientes diabéticos.<sup>17</sup>

### 3.2.4 Tratamiento

La terapéutica de la diabetes se centra en tres objetivos íntimamente relacionados:

- ✳ mejorar la utilización de la glucosa y otros nutrientes en los tejidos (aminoácidos, glicerol, ácidos grasos y cuerpos cetónicos)
- ✳ normalizar al máximo posible los niveles de glucemia sin perturbar de manera notable el estilo de vida del paciente <sup>18</sup>
- ✳ ajustar una dieta de acuerdo a las necesidades vitales de cada paciente.

#### 3.2.4.1 Sulfonilureas

Son fármacos derivados de las sulfamidas, en los cuales la estructura sulfonilurea constituye el grupo esencial de la actividad hipoglucemiante. A corto plazo, las sulfonilureas provocan la liberación de insulina preformada en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas porque aumentan su sensibilidad a la glucosa. Algunos ejemplos de ellos son:

Acetohexamida, Tolbutamida, Tolazamida, Clorpropamida, Glibenclamida, Glibornurida, Gliclazida, Glimepirida, Glipentida, Glipizida, Gliquidona.<sup>18</sup>

##### 3.2.4.1.1 Tolbutamida

Es un fármaco que se absorbe bien, pero se metaboliza demasiado rápido en el hígado.<sup>19</sup> La duración del efecto es de 6-12 horas, la dosis diaria va de 500-3000 mg y la eliminación renal es de 100%.<sup>18</sup>

#### **3.2.4.1.2 Glibenclamida**

La absorción de este fármaco es rápida y total después de la administración oral. Se alcanza el nivel máximo en suero en 1-2 horas,<sup>20</sup> la duración del efecto va de 10-24 horas<sup>18</sup>, se inicia con 2.5-5 miligramos al día.<sup>20</sup>

#### **3.2.4.2 Biguanidas**

Son derivados biguanídicos de los que el único aceptado es la metformina, debido a que aumenta el metabolismo de la glucosa en los tejidos, en particular de la glucólisis anaerobia, reducción de la gluconeogénesis hepática e inhibición de la absorción de glucosa, aminoácidos y otros compuestos a nivel intestinal.<sup>18</sup>

#### **3.2.4.3 Tiazolidinedionas**

Son fármacos hipoglucemiantes que se caracterizan por sensibilizar o incrementar la acción de la insulina sin que aumente su secreción, por lo que son útiles en situaciones en que se desarrolla resistencia a la insulina. La troglitazona es el más estudiado, seguido de la pioglitazona y la ciglitazona. La troglitazona aumenta la captación de glucosa por parte de algunas células y la fijación de la insulina a membranas.<sup>18</sup>

#### **3.2.4.4 Inhibidores de $\alpha$ glucosidasas**

Para que los carbohidratos de la dieta se absorban, deben ser hidrolizados en monosacáridos en el tubo intestinal. Los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos son transformados en monosacáridos mediante la hidrólisis producida por las  $\alpha$ -glucosidasas, glucoamilasa, sacarasa, maltasa e isomaltasa, que se encuentran en la superficie luminal de las microvellosidades intestinales, estando su máxima concentración en el tercio superior del duodeno desde dónde

desciende progresivamente hasta el íleon. La inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas reducirá la formación de monosacáridos y, consiguientemente, la disponibilidad de la glucosa y otras hexosas para ser absorbidas en el intestino.<sup>18</sup>

### 3.3 Páncreas

El páncreas endócrino está compuesto de nidos de células (islotos de Langerhans) que se distribuyen en todo el páncreas exocrino. Estos islotos constituyen solo el 1% del total del páncreas. Cada una de los tipos de célula de los islotos sintetiza un producto secretor diferente. Las células  $\beta$  secretoras de insulina son el tipo de célula predominante, producen insulina. La mayor parte del resto de las células de los islotos, células  $\alpha$  secretoras de glucagon y células  $\delta$  secretoras de somatostatina, secretan hormonas que contrarrestan los efectos de la insulina.<sup>17</sup>

#### 3.3.1 Síntesis de insulina

La insulina es un polipéptido de 51 aminoácidos, 5.8 kiloDalton (kD), sintetizado preferentemente por las células  $\beta$  del páncreas. Consta de dos cadenas, la A con 21 aminoácidos y la B con 30, unidas entre sí por dos puentes disulfuro; la cadena A tiene además otro puente disulfuro entre sus aminoácidos 6 y 11.<sup>18</sup> El precursor de la insulina, la preproinsulina (11.5 kD), se sintetiza en los ribosomas y entra al retículo endoplásmico de las células  $\beta$ , donde enzimas microsómicas la dividen con prontitud para formar proinsulina (9 kD). La proinsulina, que consiste en cadenas A y B unidas por un péptido C de 31 aminoácidos, se transporta al aparato de Golgi, donde ese traduce en vesículas secretoras. Mientras se encuentra en la vesícula secretora, la proinsulina es dividida en dos sitios para

formar insulina (51 aminoácidos) y el fragmento péptido C. En consecuencia, la secreción de insulina se acompaña de una secreción equimolar de péptido C y de pequeñas cantidades de proinsulina que escapan a la división.<sup>17</sup>

La liberación de insulina en el páncreas está sometida a múltiples factores de regulación, químicos, nerviosos y hormonales pero, como es lógico, son las modificaciones de los principales sustratos energéticos (glucosa, aminoácidos, ácidos grasos libres, cuerpos cetónicos) los que inducen modificaciones inmediatas en la respuesta.<sup>18</sup>

### **3.3.2 Regulación de la secreción**

La glucosa es el estimulante fisiológico primario de la liberación de insulina. La entrada de glucosa hacia las células  $\beta$  es facilitada por el transportador de glucosa GLUT-2, que se encuentra en cantidades excesivas y permite el transporte bidireccional de glucosa, lo que crea un equilibrio entre las concentraciones de glucosa extracelular e intracelular. Una vez en la célula, el metabolismo de la glucosa - más que la glucosa en sí - estimula la secreción de insulina.<sup>17</sup>

La glucocinasa, es una enzima con baja afinidad por la glucosa cuya actividad está regulada por esta última, controla el primer paso en el metabolismo de la glucosa: fosforilación de la glucosa para formar glucosa 6-fosfato. La glucólisis origina un aumento del trifosfato de adenosina (ATP), que bloquea canales de  $K^+$  dependientes de ATP en la membrana de las células  $\beta$ . La despolarización celular resultante permite que entre  $Ca^{2+}$ , lo cual desencadena exocitosis de gránulos que contienen insulina.

La secreción de insulina es inhibida por las catecolaminas y por la somatostatina.<sup>17</sup>

### 3.3.3 Mecanismo de acción

La insulina ejerce sus efectos al unirse a receptores de insulina presentes sobre la superficie de células blanco. Los receptores están presentes en el hígado, músculo y la grasa. La unión de insulina a su receptor suscita activación de una región tirosina cinasa del receptor, y autofosforilación de este último. La activación del receptor de insulina inicia una cascada de fosforilación dentro de las células, empezando con la fosforilación de una red de proteínas de acoplamiento (sustratos receptores de insulina, IRS) que captan y amplifican moléculas emisoras de señales torrente abajo, lo que por ultimo conduce a los efectos biológicos de la insulina (translocación del GLUT-4 hacia las membranas plasmáticas de las células musculares y adiposas, para captar la glucosa del torrente sanguíneo; además de la activación de la glucógeno sintasa).<sup>17</sup>

### 3.3.4 Funciones de la insulina

La insulina media cambios del metabolismo de combustible mediante sus efectos en hígado, músculo y grasa. En estos tejidos, la insulina promueve el almacenamiento de combustible y evita la desintegración y liberación de combustible que ya se almacenó.<sup>17</sup>

En hígado:

- ☀ Estimula síntesis y almacenamiento de glucógeno.
- ☀ Inhibe gluconeogénesis y glucogenólisis, no hay producción de insulina.
- ☀ Promueve la formación de precursores de ácidos grasos, cuando estimula la glucólisis



- ☀ Estimula lipogénesis
- ☀ Inhibe oxidación de ácidos grasos y producción de cuerpos cetónicos.

En músculo:

- ☀ Promueve almacenamiento de glucosa al activar síntesis de glucógeno
- ☀ Estimula síntesis de proteínas.

En células adiposas:

- ☀ Inhibe la lipólisis; se impide liberación de ácidos grasos, para la síntesis de de cuerpos cetónicos en hígado.

### 3.3.5 Glucagon

El glucagon es un péptido de 29 aminoácidos que se produce en las células  $\alpha$  del páncreas mediante procesamiento proteolítico del proglucagon, proteína precursora de mayor tamaño; que también se manifiesta en intestino y cerebro.<sup>17</sup>

El glucagon es la hormona primaria a la que se debe el incremento de las concentraciones de glucosa, se libera durante estados de estrés y ayuno. Cuando las células  $\alpha$ , detectan una disminución en la glucosa del cuerpo, liberan glucagon.<sup>21</sup>

En contraste con la estimulación de la secreción de la insulina por la glucosa, ésta última inhibe la secreción de glucagon. Las hormonas contrarreguladoras, como las catecolaminas y el cortisol aumentan la liberación del glucagon.

El hígado es el órgano blanco para la acción del glucagon, este último se une a receptores presentes sobre la superficie de los hepatocitos. Esta interacción con el receptor promueve la interacción con una proteína G estimuladora que activa la adenilil ciclasa, generando monofosfato de adenosina cíclico que activa a la

proteína cinasa A, que entonces fosforila enzimas de las cuales depende la actividad biológica del glucagon en el hígado. Estos efectos provocan:

- ✿ Gluconeogénesis y glucogenólisis
- ✿ Estimulación de oxidación de ácidos grasos y de la cetogénesis.

Los cuerpos cetónicos generados son un combustible alternativo que el cerebro puede emplear cuando no hay glucosa disponible.<sup>17</sup>

### 3.3.6 Somatostatina

La somatostatina es una hormona producida por las células  $\delta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas, incrementa la glucosa plasmática mediante la inhibición de insulina, glucagon, hormona del crecimiento, entre otras.<sup>21</sup> La somatostatina ejerce sus efectos mediante una familia de receptores que se acoplan a proteína inhibidora G, que se distribuyen de un modo específico para tejido. En el páncreas endócrino se cree que la somatostatina actúa por medio de efectos parácrinos sobre las otras células de los islotes de Langerhans, lo que inhibe la liberación de insulina.<sup>17</sup>

### 3.4 Hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, situado debajo del diafragma en la cavidad abdominal. Está compuesto por células hepáticas denominadas hepatocitos, este órgano se encarga de:

- ✳ Regular la composición química de la sangre
- ✳ Metabolismo de lípidos (triglicéridos y colesterol)
- ✳ Metabolismo de carbohidratos (producción de glucosa a partir de glucógeno hepático, aminoácidos y ácido láctico)
- ✳ Sintetizar proteínas (albumina, proteínas plasmáticas de transporte, factores de coagulación)
- ✳ Produce y segrega bilis
- ✳ Destoxifica la sangre (fagocitosis y alteración química)<sup>22</sup>

#### 3.4.1 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina es una glucoproteína  $\alpha_2$  con contenido de cobre, que tiene actividades enzimáticas (oxidasa de cobre, histaminasa y oxidasa ferrosa). Se sintetiza en hígado, donde seis a ocho átomos de cobre, la mitad como iones cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) y la otra mitad como iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) están unidos a una apoceruloplasmina. Noventa por ciento o más del cobre sérico total se encuentra en la ceruloplasmina.<sup>21</sup>

El primer método analítico de determinación de ceruloplasmina se basó en su actividad de oxidasa de cobre. Actualmente se emplean métodos inmunoquímicos, como la difusión radial y la nefelometría.<sup>23</sup>

La concentración sérica de ceruloplasmina aumenta en enfermedades de fase aguda, embarazo, tumores, en procesos inflamatorios, infecciones, traumatismos y necrosis tisular.<sup>24</sup>

### 3.5 Modelo experimental

El ratón de laboratorio es un roedor cuyo ancestro es el ratón común o ratón casero. Su taxonomía es:



Fig. 3.5 Ratón de laboratorio

Clase: Mamífera

Orden: Rodentia

Suborden: Miomorfa

Familia: Muridae

Subfamilia: Murinae

Género: *Mus*

Especie: *musculus*<sup>25</sup>

#### 3.5.1 Ratón ICR: CD1

Este grupo de ratones es de origen suizo descendiente de ratones albinos, dos machos y siete hembras, provenían de una cepa no endogámica. Fueron importados del Instituto Rockefeller en 1926 desde Lausanne Suiza. A partir de 1948 fueron establecidos en el Instituto para la Investigación del Cáncer (ICR) en Filadelfia. Un núcleo quedó en el Charles River Laboratories (CRL).<sup>26,27</sup>

El ratón CD1 pertenece a un grupo de ratones denominado no consanguíneos. Su popularidad se debe a que son mucho más baratos que las líneas consanguíneas, buenos reproductores<sup>28</sup> mamífero pequeño, fácil manejo y alimentación; un ciclo de vida corto.<sup>25</sup> Pueden utilizarse en pruebas toxicológicas, drogas de abuso, oncología, nutrición, vacunas, bacteriología, reproducción y embriología, neurología entre algunas más.<sup>26</sup>

Las condiciones para su uso, cuidado así como su control se realizaron conforme a la NOM-062-ZOO-1999.<sup>29</sup>

### 3.6 Toxicidad

Todas las pruebas descriptivas de toxicidad que se llevan a cabo con animales se basan en dos principios fundamentales:

- ☀ El primero es que cuando se cumplen los requisitos adecuados, los efectos producidos por un compuesto en los animales de laboratorio son aplicables a los seres humanos.
- ☀ El segundo principio es que la exposición de los animales de experimentación a dosis altas de los productos tóxicos es un método válido y necesario para descubrir posibles peligros para el hombre, ya que la incidencia de un efecto en una población aumenta a medida que se incrementa la dosis o la exposición.

Las pruebas de toxicidad no están concebidas para demostrar si una sustancia es segura, sino para identificar los efectos tóxicos que pueda provocar.<sup>30</sup>

#### 3.6.1 Toxicidad aguda

Se determina la LD<sub>50</sub> y otros efectos tóxicos agudos después de una o más vías de administración (siendo una de ellas la vía oral) en una o más especies, habitualmente el ratón, rata y en ocasiones el conejo. Durante un periodo de 14 días después de una dosis única se examinan los animales a diario y se registra el número de animales que mueren. Las pruebas de toxicidad aguda:

- ☀ proporcionan un cálculo cuantitativo de la toxicidad aguda DL<sub>50</sub>
- ☀ identifican los órganos diana y otras manifestaciones clínicas de toxicidad aguda
- ☀ establecen la reversibilidad de la respuesta tóxica
- ☀ orientan en cuanto al intervalo de dosis para otros estudios

### **3.6.2 Pruebas sub agudas**

Las pruebas de toxicidad sub aguda se llevan a cabo para obtener información sobre la toxicidad de una sustancia después de su administración repetida, normalmente durante 14 días y ayudan a establecer las dosis para los estudios sub crónicos

### **3.6.3 Pruebas sub crónicas**

La exposición sub crónica suele durar 90 días. El objetivo es establecer el nivel de mínimo efecto adverso observable (LOAEL), por sus siglas en ingles; determinar el nivel donde no se detectan efectos adversos (NOAEL), además de identificar y caracterizar el órgano u órganos específicos afectados por la sustancia investigada después de su administración repetida. Se emplean al menos tres dosis: una dosis alta que produce toxicidad pero con una mortalidad inferior al 10%, una dosis baja que no produce efectos tóxicos evidentes y una dosis intermedia. Los animales deben observarse una o dos veces al día en busca de signos de toxicidad. Todas las muertes prematuras deben anotarse. Al cabo de los 90 días habrá que sacrificar a los supervivientes, recogiendo sangre y tejidos para su análisis posterior. Las anomalías microscópicas y macroscópicas se anotan y se estudian.<sup>30</sup>

### **3.6.4 Pruebas crónicas**

Estos estudios son parecidos a los estudios sub crónicos mas el periodo de exposición oscila entre 6 meses y 2 años. Las pruebas de toxicidad crónica están concebidas para valorar tanto la toxicidad acumulada como el potencial carcinógeno de las sustancias químicas. Se realizan estudios anatomopatológicos a los animales que sobreviven y que mueren prematuramente.<sup>30</sup>

### 3.7 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), es un radical libre inorgánico y gaseoso. Junto con muchos otros efectos es un importante mensajero en el aparato cardiovascular y en el sistema nervioso central, tiene una función destacada en la defensa del huésped frente a numerosos patógenos y células tumorales.

El NO se sintetiza en una gran variedad de células y tejidos a partir de la L-arginina y el oxígeno molecular, en un proceso catalizado por la enzima *sintetasa del NO* (NOS).

El NO, una vez sintetizado, no se almacena, sino que se difunde libremente a través de las membranas celulares y reacciona rápidamente con otras moléculas, sobre todo con otros radicales libres y con metales de transición, como el hierro del grupo hemo. El NO al reaccionar con el grupo hemo de la hemoglobina, la ruta principal catabólica del NO endógeno, da lugar a hemoglobina nitrosilada y al ión nitrato ( $NO_3^-$ ); además, en los líquidos biológicos el NO también se puede oxidar a ión nitrito ( $NO_2^-$ ), el cual, a su vez, en presencia de hemoglobina, se oxida de forma rápida a ion nitrato.

Se tiene que tener presente que entre otras acciones, el NO puede nitrosilar muchas macromoléculas y, como resultado dañar muchas células. La producción excesiva en ciertos tejidos de NO puede tener implicaciones patológicas (neurotoxicidad, diabetes, cirrosis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, shock séptico, asma).<sup>31</sup>



#### **4. Planteamiento del problema**

La DM es un problema mundial hoy en día por lo que, como ayuda en el tratamiento complementario de ésta, se utiliza medicina herbolaria, sin conocer los efectos adversos que podría provocar su administración.

Es por ello que realizaremos una evaluación del extracto de raíz de tejocote *Crataegus mexicana*, que es una especie de planta usada para disminuir los niveles de glucosa, así como los posibles efectos adversos que podría provocar al ser usado también para disminuir el peso corporal.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivos generales

- ✿ Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico<sup>32</sup> de la raíz de tejocote *Crataegus mexicana*.

### 5.2 Objetivos específicos

- ✿ Obtener extracto etanólico de raíz de tejocote.
- ✿ Determinar la actividad hipoglucemiante del extracto usando 3 dosis (25, 50 y 100 mg/Kg).
- ✿ Evaluar efectos adversos en algunos órganos con la administración del extracto *Crataegus mexicana*.
- ✿ Determinar coeficientes de relación  $\left( \frac{\text{peso organo}}{\text{peso ratón}} \right) \times 100$
- ✿ Cuantificar nitritos y ceruloplasmina sérica en los grupos de estudio, como marcadores de daño celular.

## 6. Hipótesis

Si la administración del extracto *Crataegus mexicana* posee actividad hipoglucemiante el efecto producido en los ratones con hiperglucemia, provocará el descenso en la concentración de glucosa sanguínea.

Si realizando la comparación de los órganos, tomando en cuenta peso de cada uno y características macroscópicas, en ratones de grupos de control y de tratamiento; se encuentran diferencias entonces se demostrará el efecto adverso del extracto.

## 7. Diseño experimental

### 7.1 Tipo de estudio

Estudio prospectivo, transversal, experimental

### 7.2 Población de estudio

Ratones macho CD1 de 4 meses

### 7.3 Criterios de inclusión

Ratones macho con peso de  $40 \pm 10$  g, de 4 meses de edad.

### 7.4 Criterios de exclusión

Ratones hembra y machos de menos de 4 meses y cuyo peso es menor a 30 g.

### 7.5 Criterios de eliminación

Ratones macho con lesiones en patas, orejas, cola.

### 7.6 Variables dependientes

- ✱ Peso de ratones
- ✱ Concentraciones de glucosa en sangre
- ✱ Concentración de nitritos
- ✱ Concentración de ceruloplasmina

### 7.7 Variables independientes

- ✱ Solución salina, dosis de extracto 25, 50 y 100 mg/Kg de peso.

## 8. Material y método

- ✿ Balanza analítica Ohaus Explorer Pro
- ✿ Balanza granataria
- ✿ Báscula de dieta Tecno Cor
- ✿ Marcadores indelebles
- ✿ Rotavapor Yamato
- ✿ Sonicador S&M 0603 Ultrasonic Processor, SONICS Vibra-Cell
- ✿ Estufa Shel Lab 36.7°C
- ✿ Centrífuga HERMLE Z233M-2
- ✿ Centrífuga Premiere XC-2000
- ✿ Centrífuga Hamilton Bell VanGuard V6500 BIOHAZARD
- ✿ Espectrofotómetro JENWAY 6305 UV/Vis Spectrophotometer
- ✿ Celdas de plástico para espectrofotómetro
- ✿ Jeringas de insulina, 3, 5, 10 y 20 mL
- ✿ Sondas gástricas
- ✿ Tubos Falcon de 10 mL
- ✿ Caja Falcon estéril de 200 mL
- ✿ Regla 5 mm
- ✿ Sacabocados
- ✿ Glucómetro ACU-CHEK con tiras reactivas
- ✿ Estuche de disección
- ✿ Cajas Petri
- ✿ Placas para Inmunodifusión radial
- ✿ Piseta de 500 mL
- ✿ Vasos de precipitados 10, 50, 150, 600, 1000 mL PYREX
- ✿ Baño maría Yamato Water Bath BM500
- ✿ Tubos de ensayo 13 x 100
- ✿ Tubos Eppendorf de 2 mL
- ✿ Gradillas
- ✿ Pipetas automáticas 5, 10, 50, 100, 200-1000  $\mu$ L
- ✿ Extracto etanólico de raíz de tejocote

- ✿ Solución salina estéril PiSA
- ✿ Dextrosa DX-50 PiSA Solución inyectable 50%
- ✿ Goma Ghatti
- ✿ Tolbutamida Laboratorios Silanes S.A. de C.V.
- ✿ Glibenclamida
- ✿ Agua destilada
- ✿ Suero de conejo anti-ceruloplasmina de ratón
- ✿ Buffer salina fosfatos (PBS)
- ✿ Agarosa
- ✿ Cadmio
- ✿ Sulfato de Zinc HYCEL DE MÉXICO S.A. de C.V.
- ✿ Sulfato de Magnesio
- ✿ Cloruro de Amonio
- ✿ Borato de sodio
- ✿ Nitrito de sodio J.T Baker
- ✿ HCl
- ✿ Sulfanilamide MERCK
- ✿ N-(1-naphthyl) ethyl-enediamine SIGMA CHEMICAL CO.

## 8.1 Colección de la planta *Crataegus mexicana*.

- ☀ La colección de la raíz fresca de tejocote se llevó a cabo en Hueyotlipan Tlaxcala, perteneciente a la meseta del Altiplano Central aproximadamente a las 11:00 de la mañana, durante el otoño; en una zona agrícola.
- ☀ Se colectaron 300 g de raíz y algunas ramas con hojas y fruto para colocarse en periódico.

### 8.1.1 Tipificación de la planta

Una muestra representativa de la planta se mandó autenticar al Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Centro Médico Nacional Siglo XXI con la Maestra Abigail Aguilar Contreras; el número de registro asignado fue **IMSSM 15880**, cuyo género y especie determinada fue *Crataegus mexicana*, antes denominada *Crataegus pubescens*.

### 8.1.2 Obtención del extracto de raíz de tejocote

- ☀ Se lavaron y secaron 200 g de raíz de tejocote
- ☀ Se molieron y maceraron en 800 mL de etanol al 70 % durante tres días, cubriéndola de la luz.
- ☀ Se filtró a vacío y se colectó el filtrado en un matraz balón de 1000 mL.
- ☀ Se colocó en rotavapor durante cinco horas a una temperatura de 50°C.
- ☀ El extracto obtenido se colocó en estufa para secarlo durante 12 días.

## 8.2 Preparación de soluciones del extracto *Crataegus mexicana*

Para las soluciones administradas de extracto se pesaron:

- ☀ 5 mg/mL para la dosis de 25 mg/Kg
- ☀ 10 mg/mL para la dosis de 50 mg/Kg

- ☀ 20 mg/mL para la dosis de 100 mg/Kg
- ☀ Se uso solución salina para disolver los extractos, utilizando sonicador.

Para la evaluación de toxicidad de *Crataegus mexicana* se utilizaron 24 ratones distribuidos en 4 grupos de 6 ratones a los cuáles se les administró durante 21 días por sonda gástrica:

- ☀ Grupo 1: testigo, solución salina
- ☀ Grupo 2: muestra, extracto 25 mg/Kg
- ☀ Grupo 3: muestra, extracto 50 mg/Kg
- ☀ Grupo 4: muestra, extracto 100 mg/Kg

### 8.3 Preparación de soluciones para efecto hipoglucemiante

Goma Ghatti

- ☀ S preparó un volumen de 110 mL de solución de Goma Ghatti al 1% con 1.1g de Goma Ghatti y 110 mL de agua destilada
- ☀ Con ciclos de 10 segundos en horno de microondas se calentó hasta disolver la Goma Ghatti
- ☀ Con esta solución se disolvieron los fármacos Glibenclamida y Tolbutamida.

Solución de Glibenclamida:

- ☀ 16 mg de Glibenclamida en 100 mL de Goma Ghatti al 1%, cuya dosis administrada fue de 0.8 mg/Kg de peso.

Solución de Tolbutamida:

- ☀ 80 mg de Tolbutamida en 10 mL de Goma Ghatti al 1%, para administrar a dosis de 40 mg/Kg de peso.



Solución glucosada:

- ☀ Dextrosa al 50 %, se diluyó 1:10 con solución salina estéril, para administrar a dosis de 2 g/Kg de peso.

#### **8.4 Efecto hipoglucemiante**

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante se utilizaron 36 ratones distribuidos en grupos de 6 los cuales se mantuvieron en ayuno durante 15 horas:

- ☀ Grupo 1: control negativo, solución salina
- ☀ Grupo 2: muestra, 25 mg/Kg
- ☀ Grupo 3: muestra 50 mg/Kg
- ☀ Grupo 4: muestra 100 mg/Kg
- ☀ Grupo 5: control positivo, Glibenclamida 0.8 mg/Kg
- ☀ Grupo 6: control positivo, Tolbutamida 40 mg/Kg

Inicialmente a tiempo 0, en cada grupo se midió glucosa basal. Se colocó una gota de sangre de la punta de la cola del ratón, en una tira para glucómetro y se midió la concentración de glucosa. Después se administró vía oral con sonda gástrica la solución (salina, extractos, Tolbutamida y Glibenclamida) según el grupo a tratar; seguido de la administración de la solución glucosada, vía subcutánea. A pasados 60 minutos se midió concentración de glucosa y se realizó una segunda administración de solución glucosada, vía subcutánea. Después de la segunda administración de solución glucosada se midió la concentración de glucosa cada 60 minutos hasta obtener niveles de glucosa basal, es decir, a tiempo 240 minutos.

## 8.5 Obtención de órganos

Al día siguiente de realizado el ensayo del efecto hipoglucemiante, los ratones fueron pesados, después se anestesiaron en cámara de éter y mediante una incisión en el plexo axilar se obtuvo sangre de cada ratón, se separó el suero para realizar pruebas de nitritos y de ceruloplasmina. Se realizó la disección de órganos: corazón, hígado, bazo y riñones; los cuales se pesaron y registraron sus características macroscópicas determinado su coeficiente de relación órgano-animal.

$$\left( \frac{\text{peso órgano}}{\text{peso ratón}} \right) \times 100$$

## 8.6 Análisis de nitritos

- ☀ A 100  $\mu\text{L}$  de plasma se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada (dilución 1:4),
- ☀ Se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de solución de  $\text{ZnSO}_4$ , se mezcló bien y el precipitado se separó por centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos.

### 8.6.1 Activación del cadmio.

- ☀ Se colocaron 0.5 g de cadmio metálico en 33 tubos de 13 x 100 limpios, en la campana de extracción.
- ☀ El cadmio se plateó con una solución acuosa de  $\text{CuSO}_4$  al 5 % (2 mL), se agitó hasta que el cadmio se plateó, aproximadamente 10 minutos en un rocker.
- ☀ Se lavó exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre, 3 lavados con el tubo lleno

- ☀ Se lavó con HCl 0.1N para remover todo el Cd (OH)<sub>2</sub>, aproximadamente 2 volúmenes con el tubo lleno.
- ☀ Finalmente se lavó el Cadmio con NH<sub>4</sub>Cl (solución acuosa al 5% ajustado a pH 9 con borato de sodio).

### 8.6.2 Preparación de las muestras.

- ☀ A los tubos con el cadmio activado sin NH<sub>4</sub>Cl, se adicionaron los sobrenadantes de las muestras, se dejaron tapados y con agitación en un rocker durante 15 minutos.
- ☀ Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 5 minutos y se tomaron 200 µL de sobrenadante.
- ☀ Se preparó una solución de nitrito de sodio de 2 µg/mL.
- ☀ Se construyó una curva de calibración
- ☀ Se utilizaron 6 tubos para la curva estándar en donde el volumen colocado, de nitrito de sodio de 2 µg/mL en cada tubo fue:

Tubo 1: 0 µL

Tubo 2: 100 µL

Tubo 3: 200 µL

Tubo 4: 300 µL

Tubo 5: 400 µL

Tubo 6: 500 µL

Y 33 tubos para muestra: 200 µL de sobrenadante

- ☀ Se completó un volumen de 900 µL con agua destilada en todos los tubos

- ✿ Se adicionaron 50  $\mu$ L de sulfanilamida e incubaron 10 minutos a temperatura ambiente
- ✿ Continuando con la adición de 50  $\mu$ L de reactivo de NED se mezcló e incubó 30 minutos a temperatura ambiente
- ✿ Tubos de la curva estándar y muestra se leyeron a 540 nm
- ✿ Se interpolaron resultados con la curva estándar y se determinaron las concentraciones de nitritos en cada muestra

### 8.7 Ceruloplasmina

- ✿ Se colocaron 0.2g de agarosa en 20 mL de PBS (Buffer Salina Fosfatos) en matraz Erlenmeyer y se adiciono una pizca de azida de sodio.
- ✿ Se disolvió con ciclos de 10 segundos en microondas.
- ✿ Se colocaron 9 tubos de ensaye de 13 x 100 en baño maría a 45°C.
- ✿ Se adicionó a cada tubo 2 mL de agarosa 1% y 150  $\mu$ L de suero anti-ceruloplasmina de ratón,
- ✿ Se mezcló en vortex y se vertió en placas para Inmunodifusión radial.
- ✿ En cada placa se perforaron 4 pocitos con sacabocados
- ✿ Se colocaron 5  $\mu$ L de la muestra de suero de cada ratón.
- ✿ Se dejó reposar media hora y mantuvieron en refrigeración para leerse a las 48 horas los halos de precipitación.
- ✿ Se midieron los halos de precipitación (mm) y se interpolaron los resultados con la curva estándar, tomando en cuenta que en 4mm hay una concentración de 21.6 mg/dL de ceruloplasmina.

## 8.8 Análisis estadístico

Para realizar la comparación de las medias de los grupos de tratamiento y control, grupo 1 (solución salina), grupos 2, 3 y 4 (extractos 25, 50 y 100 mg/Kg) y grupos 5 y 6 (Glibenclamida 0.8 mg/Kg y Tolbutamida 40 mg/Kg) en el efecto hipoglucemiante; además de las concentraciones de ceruloplasmina y nitritos, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), seguido de la Prueba de Tukey. Se consideró un nivel de confianza de 95%, utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 18.

Partiendo de que de acuerdo al tratamiento o prueba realizada se tienen dos hipótesis.

Hipótesis nula ( $H_0$ ): las medias de los grupos de tratamiento y control son iguales cuando se obtiene un valor de significancia mayor o igual a 0.05.

Hipótesis alterna ( $H_a$ ): las medias de los grupos de tratamiento y control son diferentes cuando se obtiene un valor de significancia menor o igual a 0.05.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 \quad \text{sig.} \geq 0.05$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6 \quad \text{sig.} \leq 0.05$$

A partir de los resultados obtenidos se graficaron las medias  $\pm$  el error estándar a una  $p < 0.05$  para los grupos de tratamiento de control; utilizando el programa Sigma Plot 11.0

## 9. Resultados

### 9.1 Ensayo de toxicidad

Durante la segunda semana de la administración del extracto, se observó en un ratón del grupo de dosis de 100 mg/Kg, ratón 4, la falta de movimiento e hipotermia, el abdomen de gran tamaño (Fig. 9.1.1 y 9.1.2) y se sacrificó al ratón.

En la tercera semana del tratamiento, se observó una conducta similar en un ratón de dosis de 50 mg/Kg en cuanto al abdomen grande, al día siguiente el tamaño del abdomen regreso a su normalidad y se continuó con la administración del extracto. El tamaño grande del abdomen se observó en otra ocasión pero regreso a la normalidad al día siguiente.

Al finalizar la tercera semana de la administración un ratón de dosis de 100 mg/Kg, el ratón 6, se encontraba hipotérmico y con poco movimiento; se sacrificó y se abrió del abdomen. El intestino estaba lleno de gas y de contenido fecal, este tipo de situación se llega a presentar cuando existe íleo paralítico; probablemente es la situación que se presentó en este ratón (Fig.9.1.3, 9.1.4 y 9.1.5) En la disección de los órganos en este ultimo ratón, el hígado se observó friable (al manipularlo se podía fraccionar fácilmente).



Fig. 9.1.1 Ratón con hipotermia



Fig. 9.1.2 Ratón con aumento de abdomen



Fig. 9.1.3 Intestino con gas y contenido fecal

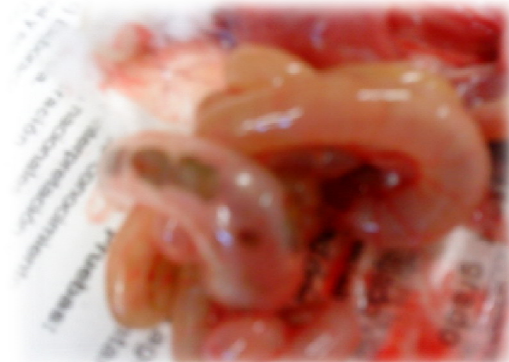


Fig. 9.1.4 Acercamiento de Fig 9.1.3



Fig. 9.1.5 Intestino con gas

### 9.1.1 Disminución de peso

Para determinar la disminución de peso en los ratones, se consideraron los pesos iniciales y finales obtenidos durante la administración del extracto a distintas dosis y la solución salina usada como control negativo. Sin encontrar diferencias que determinaran que el extracto provoque este efecto (Tabla 9.1.1)

Solución salina	Extracto 25 mg/Kg	Extracto 50 mg/Kg	Extracto 100 mg/Kg
-5	-4.5	-5.83	-6.87

Tabla 9.1.1 Pesos perdidos en ratones con tratamiento.

### 9.2 Índices de órganos

El análisis estadístico realizado a los índices de órganos no mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. (Tabla 9.2).

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Í cardíaco</b>	Inter-grupos	.003	3	.001	.213	.886
	Intra-grupos	.090	19	.005		
	Total	.093	22			
<b>Í esplénico</b>	Inter-grupos	.060	3	.020	1.193	.339
	Intra-grupos	.317	19	.017		
	Total	.377	22			
<b>Í hepático</b>	Inter-grupos	6.068	3	2.023	1.763	.188
	Intra-grupos	21.801	19	1.147		
	Total	27.869	22			
<b>Í renal</b>	Inter-grupos	.141	3	.047	1.497	.248
	Intra-grupos	.597	19	.031		
	Total	.738	22			

Tabla 9.2 Índices de órganos.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y control.



### 9.3 Ceruloplasmina

Las concentraciones de ceruloplasmina encontradas en el suero de los ratones no generaron diferencias significativas después de analizarlas estadísticamente (Tabla 9.3).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	204.783	3	68.261	.677	.577
<b>Intra-grupos</b>	1815.210	18	100.845		
<b>Total</b>	2019.993	21			

Tabla 9.3 Concentración de ceruloplasmina  
No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y el control.

### 9.4 Nitritos

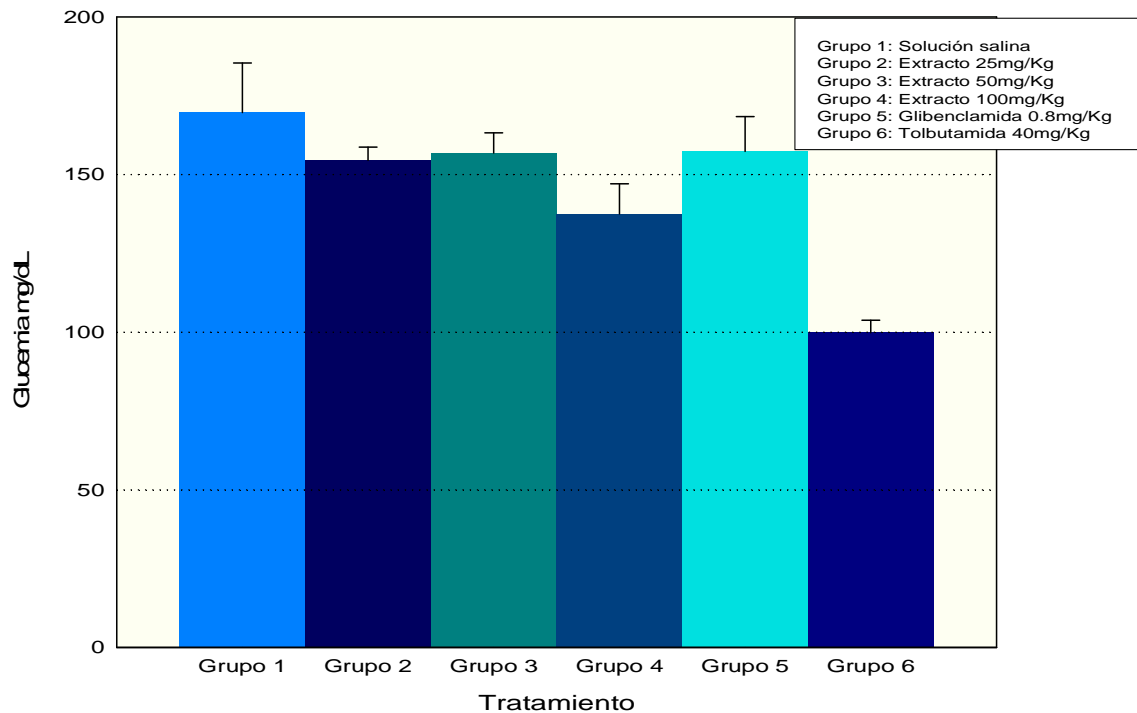
Los resultados obtenidos en el análisis estadístico no mostraron diferencias significativas entre las medias para los grupos de tratamiento (Tabla 9.4).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	40871.844	3	13623.948	.533	.666
<b>Intra-grupos</b>	460194.756	18	25566.375		
<b>Total</b>	501066.600	21			

Tabla 9.4 Concentraciones de nitritos  
No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y el control.

## 9.5 Efecto hipoglucemiante

### 9.5.1. Efecto hipoglucemiante a tiempo 1 (60 minutos), con solución salina, extractos 25, 50 y 100 mg/Kg, Tolbutamida y Glibenclamida.



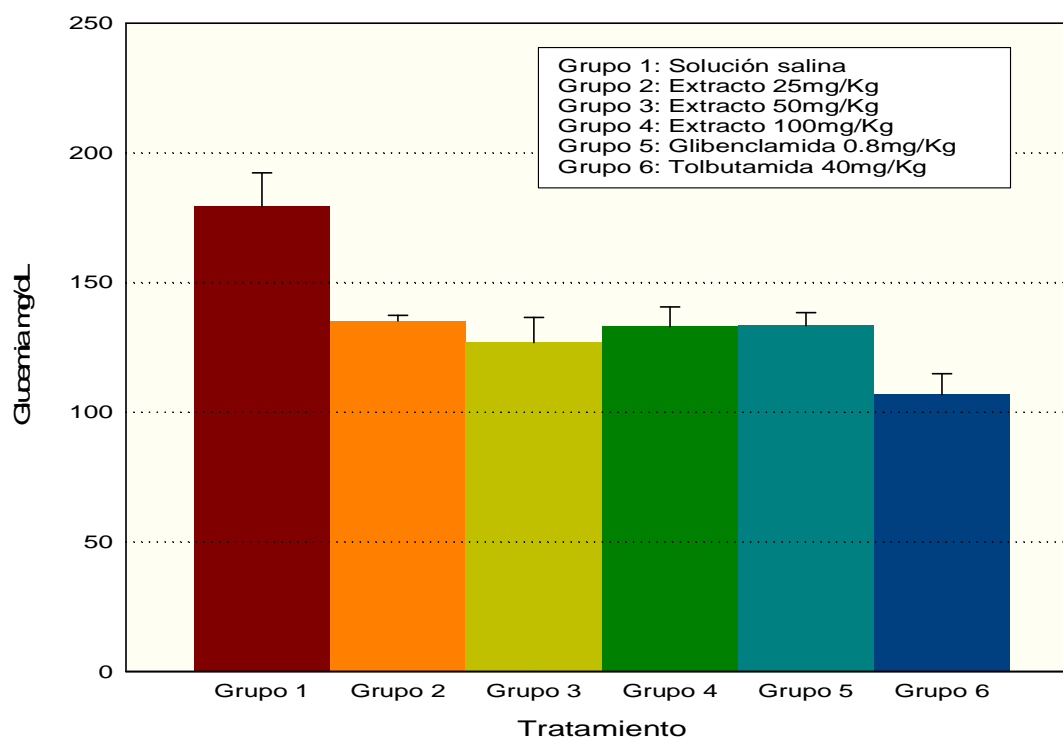
Grafica 9.5.1. Efecto hipoglucémico obtenido en extracto a dosis de 100 mg/Kg. Los valores representan las medias  $\pm$  el error estándar a una  $p < 0.05$  para los grupos 4 y 6 que generaron diferencias significativas comparados con los grupos 1, 2, 3 y 5.

#### 9.5.1.1 Prueba post hoc de Tukey a tiempo 1 (60 min).

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Tolbutamida 40 mg/Kg	6	99.83333	
Extracto 100 mg/Kg	4	137.50000	137.50000
Extracto 25 mg/Kg	6		154.50000
Extracto 50 mg/Kg	6		156.83333
Glibenclamida 0.8 mg/Kg	6		157.33333
Solución salina	6		169.66667
<b>Sig.</b>		.094	.205

Tabla 9.5.1.1 A tiempo 1, la diferencia de medias es significativa a 0.05 para extracto a 100 mg/Kg y Tolbutamida

### 9.5.2. Efecto hipoglucemiante a tiempo 2 (120 minutos), con solución salina, extractos 25, 50 y 100 mg/Kg, Tolbutamida y Glibenclamida.



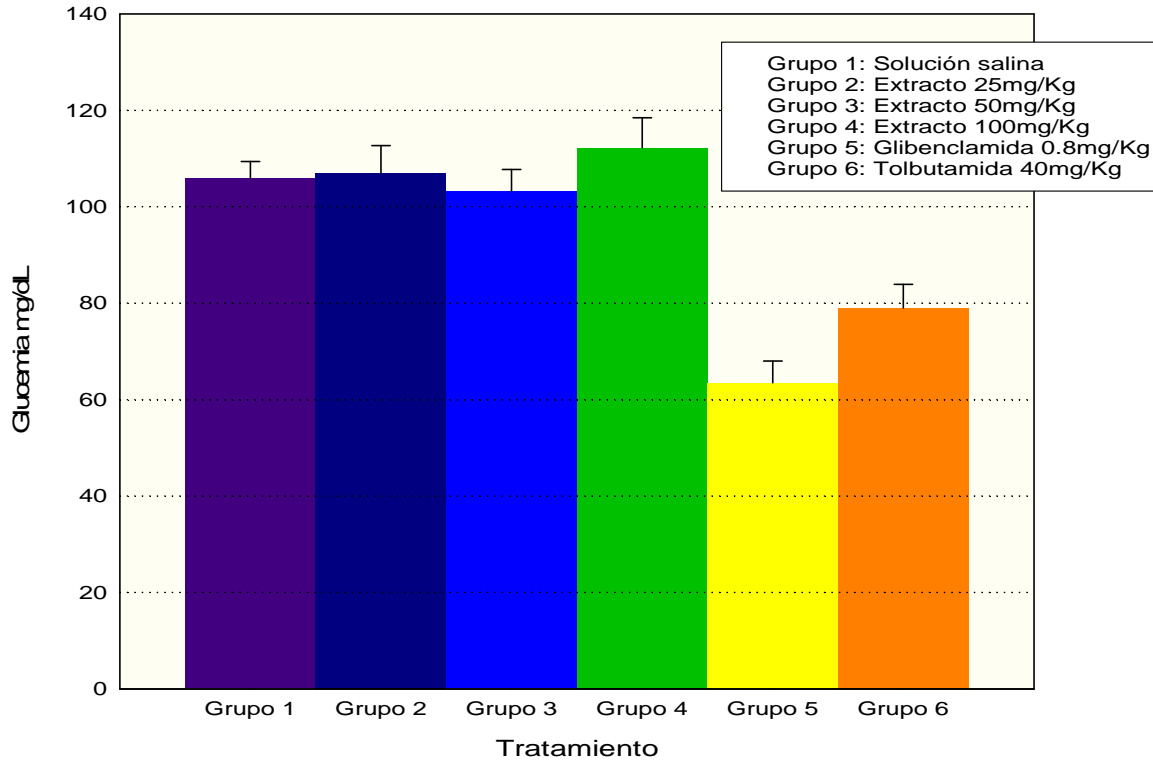
Grafica 9.5.2 Efecto hipoglucémico del extracto a 50, 100 y 25 mg/Kg, Glibenclamida y Tolbutamida. Los valores representan las medias  $\pm$  el error estándar a una  $p < 0.05$  para los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 que generaron diferencias significativas comparados con el grupo 1.

#### 9.5.2.1 Prueba post hoc de Tukey a tiempo 2 (120 minutos)

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Tolbutamida 40 mg/Kg	6	106.66667	
Extracto 50 mg/Kg	6	126.83333	
Extracto 100 mg/Kg	4	133.00000	
Glibenclamida 0.8 mg/Kg	6	133.33333	
Extracto 25 mg/Kg	6	135.16667	
Solución salina	6		179.16667
Sig.		.215	1.000

Tabla 9.5.2.1 A tiempo 2, la diferencia de medias es significativa a nivel 0.05 para los extractos 25, 50 y 100 mg/Kg, Glibenclamida y Tolbutamida.

**9.5.3 Efecto hipoglucemiante a tiempo 3 (180 minutos), con solución salina, extractos 25, 50 y 100 mg/Kg, Tolbutamida y Glibenclamida.**



Grafica 9.2.3 Efecto hipoglucemiante del extracto a dosis de 50 mg/Kg y disminuido a 25 mg/Kg. Los valores representan las medias  $\pm$  el error estándar a una  $p < 0.05$  para los grupos 5 y 6 cuyo efecto hipoglucémico se mantiene.

**9.5.3.1 Prueba *post hoc* de Tukey a tiempo 3 (180 minutos).**

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Glibenclamida 0.8 mg/Kg	6	63.50000	
Tolbutamida 40 mg/Kg	6	79.00000	
Extracto 50 mg/Kg	6		103.16667
Solución salina	6		105.83333
Extracto 25 mg/Kg	6		107.00000
Extracto 100 mg/Kg	4		112.25000
<b>Sig.</b>		.259	.781

Tabla 9.5.3.1 A tiempo 3 la diferencia de medias es significativa a nivel 0.05, para Tolbutamida y Glibenclamida mas el efecto hipoglucemiante se observa aún en extracto de 25 y 50 mg/Kg.

## 10. Discusión de resultados

El uso de la raíz de tejocote en pacientes con DM2 se ha reportado muy poco, así como los estudios realizados en ella. El uso de plantas medicinales para tratar algunos padecimientos suele ser una buena alternativa ya que sus costos son menos elevados si se compararan con los generados por algunos fármacos para tratar la enfermedad. La raíz de tejocote se ha reportado para, adelgazar, como cardiotónico, diurético e hipoglucemiante; ya sea en combinación con otras plantas o sola.

En nuestro ensayo realizado acerca de la toxicidad de *Crataegus mexicana*, la raíz de tejocote, utilizando las dosis de extracto de 25, 50 y 100 mg/Kg; se encontró que el extracto por si solo posee efectos adversos en su administración, ya que a dosis de 100 mg/Kg, 2 ratones murieron, se observó íleo paralítico al diseccionarlos (Fig. 9.1.3, 9.1.4 y 9.1.5). El primero de ellos murió 10 días después de estar administrando el extracto y el segundo casi al finalizar el ensayo de toxicidad, a los 17 días. Además de observar el hígado friable, puesto que al manipularlo se fraccionaba con facilidad, lo cual indicaría daño exclusivamente al hígado. Por el día 15, a dosis de 50 mg/Kg, 5 horas después de la administración del extracto en un ratón se observó abdomen timpánico, el cual 14 horas después estaba en condiciones normales, lo cual indica que a pesar de ser una dosis menor a 100 mg/Kg también tiene efectos adversos.

Ahora bien, si la ceruloplasmina es una proteína que se encuentra presente en algunos procesos inflamatorios y es sintetizada en hígado, es un buen marcador para saber que tan dañado está éste por causas del tratamiento, sin embargo, después de realizar esta prueba; las concentraciones de ceruloplasmina no

generaron diferencias significativas entre las medias de los grupos de tratamiento ni de control.

En el análisis estadístico de los índices órgano-animal no se encontraron diferencias significativas entre las medias para los grupos de tratamiento y control, incluyendo los valores de los 2 ratones de dosis de 100 mg/Kg que murieron después de la administración del extracto; bien podría deberse a que son solo 2 de 6 ratones y se requiere de más resultados para generar esa diferencia.

La raíz de tejocote se ha empleado para disminuir el peso pero en combinación con otras plantas y en otras cantidades; quizás con ello el efecto adverso de íleo paralítico o daño al hígado no se observa tan marcado, cuando las personas lo ingieren, pero en este ensayo el extracto de raíz de tejocote *Crataegus mexicana* genera las complicaciones antes descritas.

Por otro lado, en algunas especies de *Crataegus sp.*, se menciona el efecto antioxidante que poseen, mas realizando el análisis estadístico utilizando las concentraciones de nitritos, no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los grupos de tratamiento. Bien podría ser que el efecto antioxidante podría estar presente en la especie *Crataegus mexicana*, pero en mínima cantidad.

Finalmente en el ensayo de efecto hipoglucemiante del extracto y al realizar el análisis estadístico, la diferencia significativa entre medias se obtuvo desde el tiempo 1 al minuto 60 (después de la administración del extracto, soluciones Glibenclamida, Tolbutamida y salina) y hasta el tiempo 3 a los 180 minutos.

En el tiempo 1, minuto 60 se separaron los resultados en 2 grupos, el primero se conformó por la Tolbutamida y el extracto a dosis de 100 mg/Kg, lo cual indica

que si posee efecto hipoglucémico; el segundo grupo donde los niveles de glucosa van en descenso pero en menor magnitud que Tolbutamida y extracto 100 mg/Kg, fueron solución salina, Glibenclamida, extracto 25, 50 mg/Kg. (Tabla 9.5.1.1, Gráfica 9.5.1)

A tiempo 2, minuto 120, seguido de la Tolbutamida continuó el efecto del extracto 50 mg/Kg, Glibenclamida, extracto 100 mg/Kg y finalmente extracto a 25 mg/Kg. (Tabla 9.5.2.1, Gráfica 9.5.2)

Al tiempo 3, minuto 180, los hipoglucemiantes de control (Tolbutamida y Glibenclamida) se encontraron juntos, más el efecto hipoglucemiante del extracto continuo con la dosis a 50 mg/Kg; en las dosis de 25 y 100 mg/Kg las concentraciones de glucosa obtenidas son las más altas entre los grupos a ese tiempo. (Tabla 9.5.3.1, Gráfica 9.5.3)

La Tolbutamida es un fármaco hipoglucemiante de efecto rápido pero no prolongado, comparado con la Glibenclamida, el cual el efecto es más lento y por consiguiente de mayor duración.

El efecto que se observó a dosis de 100 mg/Kg de peso, es similar al que ejerce la Tolbutamida, inicialmente el extracto a esta dosis es capaz de disminuir los niveles de glucosa pero no es un efecto mantenido; al minuto 120 los niveles de glucosa se encontraron más elevados si se comparan con los obtenidos con el extracto a dosis de 50 mg/Kg o el de 25 mg/Kg a minuto 180.

Con respecto a la dosis de 50 mg/Kg de peso, es un efecto similar a la Glibenclamida; al minuto 60 el nivel de glucosa se encontró elevado pero el efecto hipoglucemiante se observó con mayor claridad al minuto 120; conforme avanza el

tiempo al minuto 180 el efecto del extracto a esta dosis continuo descendiendo los niveles de glucosa hasta llegar a los niveles basales a minuto 240.

A dosis de 25 mg/Kg, al minuto 60 parecía que el extracto tendría un efecto parecido al que produjo la dosis de 100 mg/Kg, los niveles de glucosa estaban intermedios entre la concentración de 50 y 100 mg/Kg. Pero al minuto 120 los niveles de glucosa continuaron más altos que los grupos de control y tratamiento, al minuto 180 las concentraciones de 25 mg/Kg son más bajas que las del extracto a 100 mg/Kg pero más altos que las dosis de 50 mg/Kg, sin embargo también con esta dosis se llega a los niveles de glucosa basal a los 240 minutos.

El extracto de raíz de tejocote *Crataegus mexicana* tiene efecto hipoglucemiante. A dosis de 100 mg/Kg el efecto es similar a la Tolbutamida, rápido pero no prolongado. A dosis de 25 mg/Kg el efecto se observó prolongado y muy lento. A dosis de 50 mg/Kg, efecto parecido a la Glibenclamida, se observó mejor el efecto hipoglucemiante, empezaron a descender lentamente al inicio pero se mantuvieron en el transcurso del ensayo.



## 11. Conclusiones

- ✿ Se obtuvo el extracto etanólico de raíz de tejocote, con un rendimiento de 3.27%.
- ✿ En la dosis de 50 mg/Kg se observó mejor el efecto hipoglucemiante del extracto, a tiempo 2 y 3 (120 y 180 minutos) respectivamente.
- ✿ Dosis de 100 mg/Kg se observó la muerte de dos ratones por íleo paralítico.
- ✿ A dosis de 50 mg/Kg se observó el aumento del volumen del abdomen con presencia de meteorismo, lo cual indica íleo paralítico temporal.
- ✿ A pesar de su uso para disminuir peso, no se encontró diferencia significativa entre los pesos iniciales y finales, de los ratones.
- ✿ No se encontraron diferencias significativas en el análisis realizado en las pruebas de ceruloplasmina y nitritos.
- ✿ Aunque se observó macroscópicamente daño al hígado no se encontraron diferencias significativas en el análisis de índices de peso órgano-animal.

## 12. Bibliografía

1. NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
2. Andrade CA, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; vol: 325-348.
3. Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; 2: 137-189.
4. [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?1=3&t=&id=7778](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?1=3&t=&id=7778)
5. Torkelson AR. Scientific Names. The Cross Name Index to Medicinal Plants. USA: CRC Press Boca Raton New York; 1996. p.901.
6. Núñez CCA, Hernández MMA. La problemática de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus spp*) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2011; 2 : 141-153.
7. Burnie G, et al. Botánica. Guía ilustrada de plantas. Mas de 10,000 especies de la A a la Z como cultivarlas. China: Tandem Verlag GmbH; 2006. p.265.
8. <http://jardindelasalud.blogspot.mx/2008/12/tejocote-crataegus-pubescens-kunth.html>
9. Abdelaaty A, et al. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Letter Planta Med* 2002; 68: 539-541.
10. Kirakosyan A, et al. Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal Agricultural and food Chemistry* 2003; 51: 3973-3976.

11. Bernatoniene J, et al. The effect of Crataegus Fruit Extract and some of its flavonoids on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in the Heart. *Phytotherapy Research* 2009; 23:1701-1707.
12. Abdul-Ghani A, Amin R, Suleiman S. M. Hypotensive effect of Crataegus oxyacantha. *Int. J. Crude Drug Res.*,1987; 25: 216-220.
13. Romero CO, Reyes MH, Aguilar SL, Huerta RM, Tortoriello GJ. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2009; 8: 380-388.
14. Molares S, Arenas PM, Aguilar A. Etnobotánica urbana de productos vegetales adelgazantes comercializados en México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2012; 5:400-412
15. [http://www.jardindevida.com.mx/t\\_para\\_adelgazar.html](http://www.jardindevida.com.mx/t_para_adelgazar.html)
16. <http://www.capslim.com.mx/capslim-plus.html>
17. Mcphee SJ, Hammer GD. Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina clínica. 6a ed. China: Lange Mc Graw Hill; 2011. p.505-518.
18. Flores J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología humana. 5 ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2008. p.1051-1071.
19. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 10 ed. México: El Manual Moderno; 2007. p.718.
20. PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 56 ed. México: THOMSON; 2010. p.533, 839-840.
21. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. Química clínica. Principios, procedimientos y correlaciones. 5a ed. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2005. p.190,196.

22. Fox S. Fisiología humana. Madrid: Mc Graw Hill; 2003. p.598-600
23. Anderson S. Química clínica. México: Mc Graw Hill Interamericana; 1993.p.195.
24. Ruiz RG. Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. México: Editorial Medica Panamericana; 2004. p.210.
25. Altamirano BA. Manual para el manejo de animales de laboratorio. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 1994. p.11
26. Harlan Laboratories, Inc 2009. [www.harlan.com](http://www.harlan.com)
27. Animales de laboratorio. [www.sciencelabandzoo.com/index.php/ctmenu-item-6/ct-menu-12](http://www.sciencelabandzoo.com/index.php/ctmenu-item-6/ct-menu-12)
28. Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. Manual de genética de roedores de laboratorio.
29. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
30. Curtis DK, Watkins BJ. Fundamentos de toxicología. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2005. p.19-21.
31. Velasco MA, Del Barrio LSR, Serrano MJ, Martínez SR, Cadavid TMI. Farmacología fundamental. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana de España; 2003. p. 183-187.
32. Hernández VE et al .Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina por extractos de tejocote (*Crataegus mexicana* Moc Sessé). XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.