



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto etanólico
CPAA-MX (Compuesto de plantas con actividad antidiabética
de la ciudad de México) en un modelo de ratones CD1**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ ODÍN EFRAÍN

Director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor de tesis: Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara

**Lugar de desarrollo:
LABORATORIO 1 PLANTA ALTA DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA
DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL ZARAGOZA.**

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIIT IG300315



MÉXICO, DF 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, por permitirme la oportunidad de conseguir este logro y formarme académicamente.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser la casa que me impartió todo el conocimiento para concluir esta etapa, a los profesores que me impartieron clase y que me enseñaron el valor del conocimiento.

A mi familia:

Por mostrarme como es el mundo, por ser un punto clave a lo largo de toda la carrera, gracias a la sana rivalidad que tenemos, nos ha hecho ser mejores personas y conseguir objetivos más valiosos.

A mi director de tesis:

El Dr. Rubén Marroquín Segura, por darme la oportunidad y confianza para realizar este trabajo, por su dedicación, por su objetividad, su buen humor y sobre todo por el conocimiento que compartió conmigo, tanto académicos, como de la vida. Un gran ejemplo a seguir, un profesor que sabe tanto y no hace del conocimiento algo mezquino, si no una experiencia muy agradable y enriquecedora.

A mi asesor de tesis:

El Dr. José Luis A. Mora Guevara, por apoyarme en la realización de este trabajo, por depositar su confianza en mí para ser asesor de este proyecto y por su amabilidad para compartir su conocimiento conmigo.

A mis profesores:

A mi revisora de tesis la Dra. Teresa Corona Ortega, por su objetividad, paciencia y consejos al momento de revisar este trabajo.

A mis sinodales la M en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez y el profesor Q.F.B Francisco Javier Parada García por su amabilidad y su tiempo.

Al profesor M en C. Maurilio Flores Pimentel por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por instruirme durante etapas clave del desarrollo experimental, por su conocimiento y amabilidad a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A los profesores Yolanda, José Luis Trejo, Ricardo y Armando por hacer de mi estancia en el laboratorio un lugar muy agradable, además del conocimiento impartido por ellos.

A los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por haberme impartido clases durante la carrera, por su paciencia y por ayudarme a conseguir este logro, gracias por todo ese conocimiento y por las enseñanzas que me dieron para ser una mejor persona.

A mis amigos:

A todos ellos que me acompañaron a lo largo de esta travesía y aventura, durante la carrera y durante la realización de este trabajo, gracias por ayudarme y siempre darme razones para seguir adelante, por impactarme con sus conocimientos y talentos los cuales me ayudaron en mi formación académica.

A Sandy Isabel, mi mejor amiga de la carrera, por ser un gran apoyo a lo largo de este viaje, por ser una persona con la que siempre competí para tratar de mejorar académicamente y como persona, por ayudarme en momentos de duda y miedo durante la carrera y fuera de ella, por ser una de las personas más brillantes que conozco y se que nuestra amistad perdurara por mucho tiempo más, en las buenas y en las malas.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 1 Planta alta de la UMIEZ: Iván, Luis, Marco, Anna, Jonatán, Alejandra, Enrique, Rosa y Mauricio, por hacer de mi estancia un lugar muy divertido y agradable.

DEDICATORIAS

A mi padre Eligio, por educarme para que fuera un ser humano extraordinario, por comprenderme y dejarme resolver mis problemas de la mejor manera posible, por enseñarme que no importa dónde te encuentres ni que es lo que hagas, siempre y cuando seas feliz contigo mismo, es lo que realmente importa. Por mostrarme que el mundo es un lugar muy interesante y que vale la pena correr riesgos para conseguir logros que no cualquiera se atreve a realizar, por enseñarme el valor de la disciplina y el deber en la vida diaria, a pesar de que ya no te encuentras aquí, aún sigo aprendiendo de ti.

A mi madre Verónica, por educarme para ser una persona muy independiente, capaz de tomar mis propias decisiones sin depender de nadie, por mostrarme que nunca hay impedimentos para conseguir cosas que la gente consideraría imposible, que no hay barreras siempre y cuando seas astuto y le tengas dedicación a tus planes.

A mi hermana Emma, por ser una digna rival desde el principio, por apoyarme en las decisiones que he tomado a lo largo de la vida, por mostrarme la dedicación que le tiene a su vida académica, por apoyarme a lo largo de la carrera y la vida en general, por su alegría incluso en los momentos difíciles, eres la persona con la que más he competido y la que más admiro, siempre vas un paso delante de mí, pero se que algún día lograre alcanzarte.

A mis amigos fuera de la carrera, por apoyarme durante todo este tiempo y por ser personas extraordinarias y muy talentosas las cuales admiro, me siento muy feliz de ser parte de este grupo lleno de anécdotas y logros.

“Nunca en la historia del mundo, ningún hombre ha conseguido nada digno y valioso por medio de ruegos y súplicas”.

J.P. Morgan

Contenido

Resumen.....	1
Introducción.....	2
I. Marco teórico.....	5
1.1 Plantas medicinales.....	5
1.2 Farmacognosia.....	5
1.3 Compuestos herbolarios.....	6
1.4 Planteamiento de la herbolaria mexicana de acuerdo a la farmacopea.....	7
1.5 Mezcla CPAA-MX (Compuesto de plantas con actividad antidiabética de la Ciudad de México).....	8
1.6 Relación de especies de uso etnobotánica en la mezcla de acuerdo a la farmacopea herbolaria.....	9
1.7 Modelo Experimental.....	10
1.8 Pruebas de Toxicidad.....	11
1.8.1 Estudio de toxicidad aguda.....	11
1.8.2 Estudio de toxicidad subaguda.....	11
1.8.3 Estudio de toxicidad subcrónica.....	12
1.8.4 Estudio de toxicidad crónica.....	12
1.9 Páncreas.....	13
1.10 Insulina.....	14
1.10.1 Síntesis y metabolismo.....	15
1.10.2 Secreción.....	16
1.10.3 Mecanismo de acción.....	16
1.11 Diabetes Mellitus.....	17
1.11.1 Definición.....	17
1.11.2 Clasificación.....	17
1.11.2.1 Diabetes tipo 1.....	18

1.7.2.2 Diabetes tipo 2.....	19
1.11.2.3 Otros tipos específicos de diabetes.....	20
1.11.3 Epidemiología de la diabetes.....	20
1.11.4 Fisiopatología.....	21
1.11.5 Clínica de la enfermedad.....	22
1.8 Tratamiento.....	23
1.8.1 Agentes hipoglucemiantes orales.....	23
1.8.1.1 Sulfonilureas.....	24
1.8.1.1.1 Glibenclamida.....	24
1.8.1.1.2 Tolbutamida.....	25
II. Planteamiento del problema.....	27
III. Hipótesis.....	30
IV. Objetivos.....	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
V. Diseño experimental.....	32
5.1 Tipo de estudio.....	32
5.2 Población de estudio.....	32
5.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	32
5.4 Variables.....	32
VI. Material.....	33
6.1 Material biológico.....	33
6.2 Reactivos.....	33
6.3 Fármacos.....	33
6.4 Material de laboratorio.....	33
VII. Métodos/Diagrama de Flujo.....	35
7.1 Preparación del extracto.....	37

7.2 Preparación de reactivos.....	37
7.3 Ensayo hipoglucemiante.....	38
7.4 Ensayo de toxicidad subaguda.....	40
VIII. Resultados.....	42
8.1 Ensayo hipoglucemiante.....	42
8.2 Ensayo de toxicidad subaguda.....	47
IX. Discusión de resultados.....	51
X. Conclusión.....	54
XI. Propuesta.....	55
XII. Anexos.....	56
12.1 Obtención de la muestra sanguínea.....	56
12.2 Determinación de glucosa con el glucómetro AccuCheck® Performa.....	56
12.3 Descripción del glucómetro AccuCheck® Performa.....	57
12.3.1 Determinación de glucosa; Principio de la prueba.....	57
12.3.2 Finalidad de uso.....	58
12.3.3 Especificaciones del medidor AccuCheck® Performa.....	58
12.4 ANOVA para el ensayo biológico hipoglucemiante.....	60
12.5 ANOVA para el ensayo de toxicidad subagudo.....	61
XIII. Referencias.....	62

Resumen

Introducción: Las plantas medicinales aun constituyen el recurso más valioso, conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. La verificación de los datos de la medicina tradicional incluye bioensayos y caracterización de los principios activos. Actualmente las enfermedades crónicas se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento. En este estudio se evaluó la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico de una mezcla de plantas medicinales, la que nombramos como compuesto de plantas con actividad antidiabética de la ciudad de México (CPAA-MX), misma que es usada empíricamente por la sociedad mexicana como supuesto agente hipoglucemiante.

Objetivo: Evaluar la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico de la mezcla CPAA-MX en un modelo de ratones CD1 hiperglucémicos a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg.

Material y métodos: Se realizó una extracción con etanol en un Rotavapor. En el ensayo hipoglucemiante se utilizaron 6 grupos de 6 ratones con un peso promedio de 40g. Se siguió un esquema de inducción de hiperglucemia con la aplicación subcutánea de glucosa al inicio del ensayo y a los 60 minutos. Al inicio del ensayo los animales recibieron por sonda gástrica: Solución salina para el grupo control negativo, dosis del extracto de 25, 50 y 100 mg/kg para los grupos experimentales, Glibenclamida y Tolbutamida para los grupos positivos. Se midió la glucemia en intervalos de 60 minutos por 4 horas. Las muestras de sangre se obtuvieron por incisión en la parte distal de la cola. Para evaluar el posible efecto toxico, en el ensayo de toxicidad aguda se usaron 24 ratones machos de aproximadamente 40 g formando 4 grupos de 6 animales. Los grupos tratados recibieron una dosis de 25, 50 y 100 mg/kg del extracto mediante sonda gástrica, el control negativo solo recibió solución salina. Los animales se observaron diariamente durante 21 días. Al final del ensayo se extrajeron los órganos: Corazón, hígado, riñones y bazo y se calculó el peso relativo.

Resultados: Se observó actividad hiperglucemiante a la dosis de 50 y 100 mg/kg durante los primeros 60 minutos y a los 120 minutos solo para la dosis de 100 mg/kg. No se observaron muertes ni signos de intoxicación visibles en los animales tratados en ninguna de las tres dosis.

Conclusiones: Las diferencias significativas encontradas en el ensayo demuestran que el extracto etanólico de la mezcla CPAA-MX (Compuesto de plantas con actividad antidiabética de la ciudad de México) a una dosis de 50 y 100 mg/kg tiene actividad hiperglucemiante y no hipoglucemiante. No se encontraron diferencias significativas en el ensayo de toxicidad para ninguno de los grupos tratados.

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Se estima que hay 250.000 especies de plantas en el mundo y probablemente solo el 10% de ellas han sido probadas para algún tipo de actividad biológica. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas con propiedades medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial las utiliza, para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud. En México alrededor de 6,000 especies tienen uso medicinal. Gran parte de los tratamientos tradicionales implican el uso de extractos de plantas o sus principios activos.

Es de gran importancia continuar con el estudio de las diversas plantas medicinales, debido principalmente a que es parte de nuestro legado cultural pero que en la actualidad, aún no logra impactar a la medicina a nivel mundial, ya que sigue siendo lentamente desarticulada por el racismo y la desigualdad social, mientras que en nuestro país constituye una de sus estrategias de sobrevivencia más importantes.

La búsqueda del tratamiento antidiabético es un importante sector en el campo de la investigación farmacológica debido principalmente a que los casos de diabetes mellitus se han incrementado muy rápidamente en muy poco tiempo, lo cual es un problema de salud pública a nivel mundial, no solo por la alta incidencia, si no porque los diversos esquemas de tratamiento durante la enfermedad es de los costos más elevados.

Resulta increíble que a pesar de que México cuenta con una gran diversidad de plantas con posibles efectos hipoglucemiantes, hay muy pocas autoridades científicas como farmacéuticos y médicos, que opten por realizar estudios de farmacognosia que ayuden a evaluar la posible actividad que presentan estas plantas. Debido a que es un asunto de interés público, es importante evaluarlas para informar e incluso alertar si estas no muestran actividad y presentan problemas relacionados al uso como lo pueden ser la toxicidad o posibles efectos adversos.

Por lo anterior y teniendo en cuenta los usos y estudios sobre las propiedades biológicas que comparten diversas plantas utilizadas de manera combinada, en este proyecto buscamos evaluar la actividad hipoglucemiante de una mezcla de 10 plantas que durante años se ha comercializado en la ciudad de México con la promesa de ser efectiva en el tratamiento de la diabetes, a esta mezcla la denominamos CPAA-MX (Compuesto de plantas con actividad antidiabética de la Ciudad de México) y la evaluaremos en un modelo de ratones CD1, para observar su posible actividad como hipoglucemiante, comparándolo con dos fármacos de referencia (Glibenclamida y Tolbutamida) para conocer si se comporta como alguno de estos fármacos.

Este estudio no tratar de desmentir ni desacreditar la medicina tradicional, ni tampoco a los productos que se ofrecen en estos lugares. En este trabajo trataremos de llevar la práctica tradicional a un modelo de práctica experimental con evidencia mediante ensayos biológicos, toxicológicos y farmacológicos. Lo cual actualmente sigue siendo uno de los retos más grandes de la farmacopea de

herbolaria mexicana, ya que a base de modelos científicos pretende establecer poco a poco la medicina tradicional en la educación médica, en la investigación clínica y en la práctica terapéutica.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS MEDICINALES

La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.¹

Una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contenga en una de sus estructuras, o en toda la planta, los principios activos con actividad farmacológica que se pueden utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como diseño para obtener nuevos fármacos por hemisíntesis.²

Estas moléculas conocidas como principios activos, generalmente son del producto del metabolismo secundario de la planta; además de que su concentración y calidad dependen de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, entre otros. Una sola planta medicinal puede contener de ocho a diez principios activos.³

1.2 FARMACOGNOSIA

Es la rama de las ciencias farmacéuticas que estudia las materias primas y las sustancias de origen biológico (vegetal, animal o microbiológico) con fines terapéuticos. Estudia tanto sustancias con propiedades terapéuticas como sustancias tóxicas, excipientes u otras sustancias de interés farmacéutico.⁴

Dentro de sus principales objetivos está el establecer las propiedades farmacológicas de las drogas vegetales e investigar nuevos principios activos que puedan constituir un punto de partida para el diseño de nuevos fármacos en el futuro.⁵

1.3 COMPUESTOS HERBOLARIOS

Durante muchos años las plantas se han utilizado en la medicina tradicional debido a las propiedades que tienen estas para contrarrestar o actuar de manera efectiva durante el tratamiento de diversas enfermedades.⁶

Por mucho tiempo se han estudiado las plantas de manera individual, puesto que a pesar de que diversas plantas comparten efectos similares, depende también la cantidad de principio activo que presenta cada planta. Sin embargo últimamente se ha comenzado a realizar diversos estudios sobre el efecto que tienen las plantas cuando se utilizan en combinación o mezcla, esto es cuando se combinan 2 o más especies con el fin de buscar y establecer si el compuesto funciona de manera más eficiente que la planta particular.⁷

Actualmente muchos tratamientos tradicionales utilizan una mezcla de diversas plantas, desafortunadamente los estudios que comprueban la eficacia y la posible toxicidad que tienen estas mezclas son muy pocos y no se tienen documentadas las mezclas que son efectivas y que nos puedan ayudar durante el tratamiento de una enfermedad en particular.⁸

1.4 PLANTEAMIENTO DE LA HERBOLARIA MEXICANA DE ACUERDO A LA FARMACOPEA

La farmacopea de herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos busca establecer de manera eficiente la integración de la medicina herbolaria en los sistemas médicos formales, para esto busca introducirla principalmente en estos sectores: Educación médica con inclusión de la flora medicinal en los programas de estudio. En la investigación clínica con adecuación de modelos experimentales y validación del abordaje clínico. En la regulación sanitaria con las adecuaciones del marco legal y con las instancias reguladoras articuladas. En la práctica terapéutica con la adecuación de recursos y procedimientos. Por último, en la industria farmacéutica con un abasto sustentable y de calidad.⁹

La farmacopea establece el referente normativo para los productores de medicamentos herbolarios con los siguientes lineamientos: métodos generales de análisis, requisitos sobre identidad y pureza, calidad del producto, aditivos y productos biológicos, sin embargo, la paradoja que presenta es que para invertir tiempo y capital en estos lineamientos, se requiere definir primero si el recurso es terapéutico, tarea que debe de realizar un laboratorio especializado o una comisión de productos naturales.¹⁰

1.5 MEZCLA CPAA-MX (COMPUESTO DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIDIABÉTICA DE LA CIUDAD DE MÉXICO)

En el presente trabajo se pretende evaluar una mezcla de plantas con un ensayo hipoglucemiante formulado por 10 plantas distintas. Se evaluará la mezcla de plantas que se comercializa en la central de abastos ubicada en la Ciudad de México. La razón por la que se evalúa la mezcla de este lugar a comparación de otros lugares en donde también se suele encontrar, es porque en este lugar no sólo se vende la mezcla, sino que también la distribuye a otras locaciones para su venta y a comparación de otros lugares, en este lugar la mezcla lleva ya muchos años comercializándose con la promesa de que es auténtica y original.

La mezcla a evaluar se compone de las siguientes plantas: Cancerina (*Hippocratea excelsa Kunth*), Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlech*) Espinosilla (*Loeselia mexicana*), Eucalipto (*Eucaliptus globulus Labill.*), Fenogreco (*Trigonella foenum-graecum.*), Mirto (*Salvia microphylla Kunth.*), Muicle (*Justicia spicigera schlechtendal.*), Ortiga (*Urtica dioica*), Tlanchalagua (*Erythraea tetramera Schiede*), Toronjil (*Agistache mexicana (Kunth) Lint & Epling*).

1.6 RELACIÓN DE ESPECIES DE USO ETNOBOTANICO EN LA MEZCLA DE ACUERDO A LA FARMACOPEA HERBOLARIA

Nombre popular	Genero	Especie	Familia	Parte utilizada	Atribuciones tradicionales	Ref.
Cancerina	<i>Hippocratea</i>	<i>excelsa</i> Kunth	<i>Hippocrateaceae</i>	Raíz	Diabetes, antiinflamatorio	8,11, 12
Cuachalalate	<i>Amphipterygium</i>	<i>adstringens</i> Schiede ex Schlech.	<i>Anacardiaceae</i>	Corteza	Diabetes, Depurador sanguíneo	8, 14,15
Espinosilla	<i>Loeselia</i>	<i>mexicana</i>	<i>Polemoniaceae</i>	Planta completa	Diabetes, depurador sanguíneo y renal	8, 12,13,16
Eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	<i>globulus labill</i>	<i>Mirtaceae</i>	Hojas	Analgésico, antipirética	11,12,13,16
Fenogreco	<i>Trigonella</i>	<i>foenum- graecum</i>	<i>Fabaceae</i>	Semilla	Diabetes, antioxidante	12,13,14
Mirto	<i>Salvia</i>	<i>micrphylia</i> Kunth	<i>Myrtaceae</i>	Hojas	Depurador renal, desinflamatorio	11,14,16
Muicle	<i>Justicia</i>	<i>spicigera</i> <i>schlechtendal</i>	<i>Acanthaceae</i>	Hojas	Diabetes, depurador sanguíneo	11,13,14
Ortiga	<i>Urtica</i>	<i>dioica</i>	<i>Urticaceae</i>	Planta completa	Diabetes, diurético	12,14,15
Tlanchalagua	<i>Erythraea</i>	<i>tetramera</i> Schiede	<i>Gentianaceae</i>	Hojas y flores	Diurético	11,12,14,16
Toronjil	<i>Agistache</i>	<i>mexicana</i> (Kunth) Lint & Epling)	<i>Lamiaceae</i>	Hojas y Tallo	Diabetes, antiinflamatorio y analgésico	11,13,14,16

1.9 MODELO EXPERIMENTAL

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos.¹⁷

En México la NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, define a un animal de laboratorio como: un animal utilizado en la investigación científica, desarrollo tecnológico, innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza.¹⁸

Para la selección de la especie a utilizar en los ensayos experimentales, se deben atender diversos criterios de disponibilidad, sensibilidad y similitud. En relación con la disponibilidad o convivencia, se suelen utilizar animales pequeños por razones económicas que condicionan la infraestructura, consumo de alimentos, gasto de producto y eliminación de residuos. Estas características hacen que los animales más empleados sean ratón, rata, hámster, conejo, cobayo y perro.¹⁹

Los roedores tienen un periodo de gestación corto, una alta tasa de fertilidad, presentan una alta velocidad metabólica, pueden ser sensibles al estrés, por lo que es barato producir grandes cantidades para la investigación. De las cepas empleadas el ratón CD1 es más utilizado debido a que es una cepa definida genéticamente, de reproducción rápida y comportamiento conocido.²⁰

1.10 PRUEBAS DE TOXICIDAD

Los modelos de estudio de toxicidad en animales son protocolos que siguen lineamientos estrictos y bien definidos diseñados para proveer una descripción de los efectos producidos por un compuesto, si estos son propiamente calificados, llegan a ser aplicables a modelos humanos. Hay que tener en cuenta que los estudios de toxicidad no están diseñados para demostrar que una sustancia, principio activo o fármaco es seguro para la salud, si no para encontrar los posibles efectos tóxicos que esta pueda generar. Los estudios toxicológicos ofrecen información sobre la dosis a partir de las cuales los efectos tóxicos comienzan a aparecer. Para lograr establecer los efectos tóxicos, se realizan estudios de toxicidad aguda, subaguda, crónica y subcrónica sobre animales de experimentación.^{21, 22}

1.10.1 Estudio de toxicidad aguda

Es la primera prueba que se suele hacer a una sustancia, principio activo o fármaco, se determina con una sola administración en un organismo, los objetivos de este estudio son proveer un estimado de toxicidad específica de la sustancia, muchas veces es expresado como dosis letal aproximada (Ld50), también provee información sobre los órganos afectados y otras manifestaciones clínicas, identificar las diferentes especies que son susceptibles, así como proveer información para poder diseñar y escoger la dosis en un estudio subcrónico.²¹

1.10.2 Estudio de toxicidad subaguda

Esta prueba está diseñada para obtener información sobre la toxicidad de una sustancia, fármaco o principio activo, después de haber repetido la dosis más de una

vez, sirviendo para establecer la dosis en el estudio subcrónico, los protocolos tradicionalmente manejan diferentes dosis de los químicos en 14 días hasta 21 días de exposición.²¹

1.10.3 Estudio de toxicidad subcrónica

La exposición subcrónica, puede manejar diferentes periodos de tiempo, desde 1 a 3 meses, en esta prueba se trata de identificar y caracterizar los órganos afectados, así como determinar daño en el organismo, por el compuesto después de haber recibido dosis repetidas. En este tipo de pruebas se realizan evaluaciones hematológicas (eritrocitos, leucocitos, hematocrito, hemoglobina, etc.), evaluaciones clínicas (perfiles enzimáticos) urianálisis, etc. Esto con el fin de hacer una predicción en relación con la dosis-respuesta en una exposición crónica.²²

1.10.4 Estudio de toxicidad crónica

Es un estudio diseñado de forma similar a la exposición subcrónica, la diferencia radica en que el estudio se prolonga de 6 meses hasta 2 años, si el estudio lo requiere, la selección de la dosis es crítica en este tipo de estudios ya que se puede llegar a provocar la muerte prematura del sujeto experimental con una dosis alta. La toxicidad crónica puede llegar a incluir caracterización carcinogénica del compuesto. El objetivo final de este estudio es encontrar toxicidad progresiva debido a que la sustancia toxica se acumula dentro del sujeto experimental.²²

1.5 PÁNCREAS

Es una glándula que está situada detrás de la parte inferior del estómago y esta inervado por el sistema nervioso autónomo. Este tiene funciones endocrinas y exocrinas. El páncreas exocrino contiene acianos que secretan el jugo pancreático que contiene enzimas digestivas y líquidos alcalinos hacia el duodeno por medio de los conductos pancreáticos. El páncreas endocrino secreta hormonas como la insulina y el glucagón; está compuesto por cúmulos de células llamados islotes de Langerhans que se distribuyen en todo el páncreas exocrino. Están dispersos en el parénquima pancreático, aunque abundan en la cola más que en el cuerpo y la cabeza de dicha glándula. Los islotes beta comprenden aproximadamente 2% del volumen de la glándula, en tanto la porción exocrina de la misma compone el 80% y el resto está integrado por conductos sanguíneos.²³

Los islotes contienen tres tipos principales de células secretoras de hormonas α , β , δ :

1. Las células α : Secreta el glucagón, que moviliza el glucógeno del hígado y suprime la secreción de la insulina; el glucagón es crucial para mantener la concentración normal de glucosa sanguínea entre las comidas.
2. Las células β : Secretan insulina, que induce el uso y almacenamiento de glucosa.
3. Las células δ : Secretan somatostina y gastrina, que regulan la función de las células α y β mediante la supresión de la liberación de insulina, glucagón y polipéptidos pancreáticos.

Las hormonas secretadas por los islotes pancreáticos son elementos de control importantes en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. La secreción de insulina aumenta cuando se incrementan: la glucemia, aminoácidos, el potasio, fosfatos y magnesio, por último el glucagón y gastrina.

La energía en forma de glucosa es esencial para el funcionamiento óptimo del organismo. La glucosa es un monosacárido derivado de los carbohidratos de la dieta. El exceso de glucosa se almacena como glucógeno en el hígado. La glucosa sanguínea induce la liberación de insulina. La insulina es una hormona anabólica necesaria para la captación de glucosa por parte de muchas células, en especial en hígado, músculo y tejido adiposo.²⁴

1.6 INSULINA

La insulina es una proteína compuesta por dos cadenas peptídicas (Cadena A y cadena B) que se conectan por dos enlaces disulfuro. Tiene un peso molecular de 5700 daltones. De una especie a otra, se detectan diferencias pequeñas en la composición de aminoácidos de su molécula; ellas casi nunca bastan para alterar o disminuir la actividad biológica de una insulina particular en una especie heteróloga, pero bastan para hacer que la insulina sea antigénica. Hoy en día se utiliza ampliamente la insulina humana producida por bacterias con tecnología de bioingeniería de ácido desoxirribonucleico (ADN), y con ello se evita la formación de anticuerpos.²³

1.6.1 Síntesis y metabolismo

Inicialmente se sintetiza como un precursor, la preproinsulina; se sintetiza en los ribosomas y entra al retículo endoplásmico de las células β , donde enzimas microsómicas la dividen con prontitud para formar la proinsulina. Esta consiste en cadenas A y B unidas por un péptido C de 31 aminoácidos, se transporta al aparato de Golgi donde se introduce en las vesículas secretoras. Mientras se encuentra en la vesícula secretora, la proinsulina es dividida en dos sitios para formar la insulina y el fragmento péptido C y de pequeñas cantidades de proinsulina que escapan a la división.²³

La insulina tiene una vida media en la circulación de 3 a 5 min y se cataboliza en el hígado en su primer paso por dicho órgano después de que se secreta a partir del páncreas hacia la vena porta. En contraste tanto el péptido C como la proinsulina solo se catabolizan en los riñones, por ende, tienen vida media 3^a 4 veces más prolongada que la de la insulina en sí.²⁴

La insulina tiene varias funciones clave:

1. Inducción del uso de glucosa a las células, lo que disminuye su concentración en el torrente sanguíneo.
2. Estimulación de la síntesis de proteínas.
3. Estimulación de la síntesis y almacenamiento de lípidos.
4. Facilitación del transporte de iones como potasio, fosfato y magnesio hacia las células.
5. La síntesis y disponibilidad de insulina depende del páncreas.

1.6.2 Secreción:

Los estímulos metabólicos más potentes para que la insulina secrete son la glucosa y los aminoácidos que actúan de manera sinérgica. Los triglicéridos y los ácidos grasos solo tienen un efecto estimulador pequeño. Como respuesta a la ingesta oral de glucosa, la secreción de insulina ocurre en dos fases:

- La primera representa la liberación de insulina almacenada en los gránulos secretores. Aproximadamente 10 minutos después, cuando los gránulos secretores se han agotado, hay una liberación de insulina gradual y sostenida que puede durar por varias horas en individuos normales y que depende de la síntesis de nuevo de la hormona.
- La producción y liberación de insulina por la célula β , incluye los siguientes eventos celulares: La glucosa entra a la célula gracias al transportador de glucosa GLUT 2, de inmediato se fosforila por la enzima hexocinasa y se inicia la glucólisis que genera ATP lo que cierra los canales de K^+ y se despolariza la membrana, esto induce la entrada de Ca^{++} que a su vez moviliza la salida de la insulina de los gránulos secretores a través de la membrana de la célula β junto al péptido C.²³

1.6.3 Mecanismo de acción

Los receptores para insulina se hallan en muchas células corporales, incluidas aquellas donde dicha hormona no regula la captación de glucosa. El receptor de insulina, con peso molecular de 340 000 aproximadamente, es un tetrámero compuesto por dos subunidades α . Estas se unen a la insulina y son

extracelulares, en tanto que las subunidades β tienen actividad sobre la tirosina cinasa. Los dos tipos de subunidades están glucosilados y los residuos con azúcar se extienden al interior del líquido intersticial. La unión de la insulina activa la tirosina cinasa de las subunidades β y así se produce autofosforilación de dichas unidades a nivel de los residuos tirosínicos. La autofosforilación es necesaria para que la insulina ejerza sus efectos biológicos; a si mismo activa la fosforilación de algunas proteínas citoplásmicas y la desfosforilación de otras, de modo predominante los residuos serínico y treonínico.²⁵

1.7 DIABETES MELLITUS

1.7.1 Definición

La diabetes comprende un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por hiperglucemia debida a la deficiencia relativa o absoluta de insulina, a largo plazo, esto genera diversos problemas en el organismo, lo cual lleva a una falla múltiple en diversos órganos, generando un riesgo para la vida del paciente.²⁶

En México la NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, define a esta como: 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 a acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas.²⁷

1.7.2 Clasificación

1.7.2.1 Diabetes tipo 1

La NOM-015-SSA2-2010 la define como: El tipo de diabetes en la que existe destrucción de células beta del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, casi siempre son delgados y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad. El manejo de la diabetes tipo 1 requiere la administración de insulina para el control en el nivel de glucosa sanguínea.²⁷

Existen varias formas:

- Tipo 1A autoinmune: Resultado de un ataque autoinmune resultado por un ataque mediado por células citotóxicas contra las células β .
- Tipo 1B: Es menos frecuente y aún no se conocen las causas, se encuentra principalmente en descendientes de africanos que tienen varios grados de deficiencia de insulina entre episodios esporádicos de cetoacidosis.
- Tipo LADA (Diabetes autoinmune latente en adultos): Se caracteriza por una progresión lenta en la deficiencia de insulina, esta ocurre en aproximadamente 10% de los pacientes adultos, al principio estos no requieren insulina, pero progresan a formas dependientes de insulina.

La diabetes tipo 1 contribuye solo en un 10% de los casos, sin embargo, su incidencia se continúa incrementando en todo el mundo y tiene serias implicaciones a corto y a largo plazo.^{28, 29}

1.7.2.2 Diabetes tipo 2

La NOM-015-SSA2-2010 la define como: El tipo de diabetes en la que hay capacidad residual de secreción de insulina, pero sus niveles no superan la resistencia a la insulina concomitante, insuficiencia relativa de secreción de insulina o cuando coexisten ambas posibilidades aparece la hiperglucemia. Este tipo de diabetes a menudo se relaciona con obesidad y estilo de vida sedentario; ésta se caracteriza por la resistencia a la insulina y deficiencia a la insulina.²⁷

En un grupo heterogéneo con pacientes obesos y fuerte predisposición genética, presentan niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control.²⁶

1.7.2.3 Otros tipos específicos de diabetes

Existen otros tipos específicos de diabetes las cuales incluyen pacientes con defectos genéticos que afectan desde la función de células beta, hasta la acción que tiene la insulina sobre las células, otros presentan patologías pancreáticas. Existen algunos fármacos o tóxicos que pueden producir diabetes secundaria (ácido nicotínico, corticoides, pentamida, clorazil y olanzapina), así como por la acción de agentes infecciosos (Coxsachie B4, citomegalovirus, rubeola congénita, parotiditis) y algunas enfermedades como síndrome de Klinefelter, Down, Turner, y lipoatrofias. La diabetes gestacional se caracteriza por hiperglucemia que aparece en el transcurso del embarazo, puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.²⁹

1.7.3 Epidemiología de la diabetes

La federación internacional de la diabetes (IDF) estima que aproximadamente 371 millones de personas la padecen a nivel y va en aumento en todos los países. Para 2011, la OPS (Organización Panamericana de la Salud) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) estiman que en el Continente Americano hay aproximadamente 62.8 millones de personas con diabetes: y calcula que en América Latina podría incrementarse de 25 a 40 millones en 2030. En México desde 2011, la incidencia de diabetes en el país es más alta en las mujeres (442.23 por cada 100 mil mujeres) que en los varones (326.81 por cada 100 mil hombres). Y las entidades que registran el mayor número de casos nuevos son Morelos, Baja California y Sinaloa, en cambio Quintana Roo, Querétaro y Chiapas son las entidades con la incidencia más baja.

Se observa también que conforme avanza la edad, aumenta la incidencia, la población de 60 a 64 años presenta la más alta (1 787.60 de cada 100 mil personas de 65 años y más). Esta tendencia es similar por sexo, tanto en hombres como mujeres a esta edad.³¹

Realizarse de manera rutinaria una prueba de detección debe ser considerada como una conducta del autocuidado y permite realizar un diagnóstico oportuno. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) y Secretaría de Salud (SSA) reportan que 49.8% cuenta con seguro médico, mientras que el 50.2% no está asegurada; y de esta 9 de cada 100 pruebas resultaron positivas

para la no asegurada, mientras que en la población asegurada, 2 de cada 100 tuvieron un resultado positivo.

A partir del año 2000 la diabetes se convirtió en la primera causa de muertes en mujeres y la segunda en hombres. La diabetes genera un considerable efecto en los sistemas de salud, por ser una de las principales causas de ingreso a hospitales. Los efectos de esta enfermedad se magnifican al afectar con mayor frecuencia a grupos de población cuyos factores sociales o económicos limitan su acceso al tratamiento.³²

1.7.4 Fisiopatología

Los distintos tipos de diabetes se caracterizan por unos o varios elementos siguientes:

- Destrucción completa de las células β del páncreas que conduce a la falta de secreción de la insulina.
- Disminución de la secreción de insulina por disfunción de las células β como respuesta a la estimulación de glucosa.
- Resistencia periférica a la insulina.

La ausencia, déficit o resistencia a la insulina genera un estado de hiperglucemia, que es el aumento de la concentración sanguínea de glucosa, aunado a la incapacidad de transportar glucosa y aminoácidos al interior de las células que dependen de la insulina para este transporte. Hígado, músculo y células adiposas quedan privados de la glucosa como fuente energética y deben recurrir a otras

fuentes menos eficientes para obtener energía como grasas corporales o incluso proteínas.²⁵

En la diabetes tipo 2, el factor de riesgo principal es la obesidad; todos los individuos con sobrepeso tienen resistencia a la insulina debido a la liberación de ácidos grasos y citocinas de las células de las células adiposas, por lo que interfieren con las señales de la insulina alterando los receptores de esta en las membranas plasmáticas de las células blanco e impiden que la insulina facilite la entrada de glucosa en la célula que la requiere. La resistencia a la insulina o la disminución de la sensibilidad a la insulina de los tejidos metabólicos, como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, conducen al inadecuado uso de la glucosa.

Solo los pacientes que no pueden compensarla mediante el incremento de la producción de insulina en las células β del páncreas desarrollan la enfermedad. Una vez que empieza a desarrollarse, la liberación hepática de glucógeno aunada a la supresión de la insulina por efecto del glucagón producen una concentración excesiva de glucosa circulante. Al haber un aumento del glucagón, este moviliza glucógeno al hígado y suprime la secreción de insulina.³⁰

1.7.5 Clínica de la enfermedad

Al principio comienzan a aparecer varias anormalidades metabólicas y síntomas típicos como: Pérdida de peso, polidipsia, poliuria y polifagia. Conforme avanza la enfermedad, suelen aparecer complicaciones las cuales resultan ser agudas, son de inicio rápido y a menudo incluyen manifestaciones intensas como la disfunción

neuronal, hipoglucemia, cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar, hiperglucemia, retinopatía y nefropatía diabética.³³

1.8 TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento, es alcanzar en forma segura concentraciones de glucosa lo más cercana posibles al intervalo fisiológico normal evitando la hipoglucemia. Además como la DM conlleva un riesgo cardiovascular y se acompaña de otros factores de riesgo en ese ámbito, otro objetivo terapéutico es mejorar dicho riesgo; sin embargo para esto, el ejercicio, la pérdida de peso y la dieta apropiada son bases importantes sobre las cuales establecer el tratamiento para la diabetes y la consideración de estos aspectos aumentaría el control exitoso sobre la glucemia.³⁴

El tratamiento actual se compone de diversos fármacos los cuales suelen ser hipoglucemiantes orales como son las sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la α -glucosidasa, tiazolidinedionas y en el último de los casos, se utiliza la insulina.

Empíricamente se utilizan diversas plantas las cuales se cree ayudan en el tratamiento de esta enfermedad al mostrar un posible efecto hipoglucemiante, sin embargo aún no hay suficientes estudios que comprueben estos efectos.³⁵

1.8.1 Agentes hipoglucemiantes orales

Son fármacos que se caracterizan por producir una disminución de los niveles de glucemia luego de su administración por vía oral, cumpliendo con este propósito a través de mecanismos pancreáticos y/o extrapancreáticos. Para la realización de este

proyecto, se utilizaran dos fármacos dentro del grupo de las sulfonilureas llamados glibenclamida y tolbutamida.³⁶

1.8.1.1 Sulfonilureas

Desde 1955 las sulfonilureas empezaron a ser muy utilizadas en el tratamiento de diabéticos no dependientes de insulina. El mecanismo de acción de estos comprende efectos pancreáticos y extrapancreáticos. Los primeros incluyen un aumento de la estimulación de las células β del páncreas para la liberación de insulina, este efecto se produce por un bloqueo de la bomba de K-ATPasa lo que se traduce en una despolarización prolongada de la membrana celular, con el consiguiente ingreso del Ca^{++} extracelular provocando la liberación de insulina de los gránulos secretorios hacia el torrente sanguíneo. Los efectos extrapancreáticos comprenden fundamentalmente un aumento de los receptores de insulina en monocitos, eritrocitos y adipocitos; aumentan el efecto de la insulina y el número de transportadores para dicha hormona; producen inhibición de la gluconeogénesis hepática y aumento del consumo de glucosa a nivel periférico. El metabolismo es fundamentalmente hepático excepto por la cloropropamida que se metaboliza escasamente (menos del 1%) y la excreción es fundamentalmente renal.^{36, 37}

1.8.1.1.1 Glibenclamida

Derivado de la sulfonilurea. Promueve el aumento de la secreción de insulina por parte de las células β de los islotes del páncreas mediante un mecanismo aún no definido. Se sabe que se une a receptores de membrana específicos de las células β del islote de Langerhans con alta afinidad, que están próximos a los canales de K^+ . Al

unirse la Glibenclamida a su receptor, se inhiben (cierran) los canales de K^+ sensibles a ATP y disminuye la permeabilidad de la membrana al K^+ , por lo que da lugar a despolarización de la membrana. La disminución de la diferencial del potencial de la membrana plasmática abrirá los canales de Ca^{++} , permitiendo la entrada de calcio y aumentando la concentración de este generando la exocitosis al alterar la actividad enzimática, lo que da lugar a la liberación de insulina. Actúa disminuyendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática. Se produce una disminución de la glucemia sólo en aquellos pacientes capaces de sintetizar insulina: no influye en la producción de insulina por las células β , pero parece potenciar su liberación desde estas células pancreáticas. Tiene una duración de acción de 24 horas, una vida media de 10 horas, el tiempo hasta la concentración máxima es de 4 horas: la absorción es rápida y su unión a las proteínas séricas es muy elevada (98 a 99%). Se metaboliza en el hígado y sus metabolitos inactivos se excretan por vía biliar el 50% y el resto por el riñón.³⁸

1.8.1.1.2 Tolbutamida

Pertenece a la familia de las sulfonilureas, se emplea para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II (no insulino dependiente). Produce un aumento de la secreción de la insulina y una reducción del umbral de sensibilidad a la glucosa de las células β y por sus efectos extra pancreáticos reduce la insulino-dependencia de los tejidos periféricos (resistencia a insulina). Genera un aumento de los receptores de insulina en distintas células (monocitos, eritrocitos y adipocitos), de este modo aumentan el efecto de la insulina y el número de transportadores de esta, produciendo una inhibición de la gluconeogénesis hepática y aumento del consumo de glucosa a nivel

periférico. Luego de su administración oral, se absorbe en forma completa por la mucosa digestiva, iniciando su efecto a las 1-2 horas para llegar al máximo de las 2 a las 5 horas. Posee una vida media larga (aprox 5 horas), una elevada ligadura proteica (95%) y una amplia biodisponibilidad (85-100%). Sufre una activa biotransformación metabólica hepática, siendo su eliminación renal (85%) y biliar (9%).³⁸

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el comienzo del siglo XXI el interés en la farmacognosia como disciplina y en los productos naturales en general, está en un alza nunca antes vista. Este fenómeno se ha reflejado en una creciente atención a remedios a base de hierbas como una forma de terapia alternativa.⁵

La diabetes mellitus es uno de los padecimientos crónico-degenerativo que se presentan en mayor proporción en la población mexicana, esto se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento y de la prevención de las complicaciones. La Organización Mundial de la Salud (OMS) pronostica que aumentara a 365 millones en el año 2030, así mismo los efectos de esta enfermedad se magnificaron al afectar con mayor frecuencia a grupos de población cuyos factores sociales o económicos limitan su acceso al tratamiento farmacológico convencional.³⁴

En México la gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural ha favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales como alternativas al tratamiento tradicional. El uso empírico de estas ha perdurado hasta nuestros días y se ha convertido en la fuente de información para la producción de nuevos medicamentos en la industria farmacéutica. En México alrededor de 4000 especies de plantas, aproximadamente 15% de la flora total tienen atributos medicinales, es decir una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa.⁷

La farmacopea de herbolaria mexicana establece que el modelo a seguir para la correcta aplicación terapéutica de plantas y compuestos medicinales y así poder ser integrado a esta en forma de monografía, debe pasar por estos tres niveles:

- Práctica tradicional: La cual es estudiada por etnobotánicos, etnofarmacólogos y antropólogos médicos.
- Práctica experimental: Evidenciada mediante ensayos biológicos, ensayos toxicológicos y farmacológicos siendo su eje de análisis el extracto de la planta o plantas.
- Práctica clínica: Se realiza con consulta médica con pacientes como espacio de integración.⁹

En diversos mercados en México es común encontrar la venta de plantas y mezclas de plantas que suponen un efecto terapéutico, desafortunadamente en la actualidad los estudios sobre la validación terapéutica de estas mezclas aún son limitados y las monografías que se encuentran en la farmacopea solo muestran las plantas de las cuales se han comprobado los efectos validados experimentalmente y los usos validados clínicamente; por lo tanto las plantas que aún no han sido demostradas ni validadas son un amplio campo de investigación no solo por la farmacopea, si no por las compañías farmacéuticas que continúan la búsqueda de principios activos más potentes y menos tóxicos.³⁹

De aquí la importancia de realizar la evaluación farmacológica de las plantas utilizadas empíricamente por la población mexicana, con el propósito de aportar información relevante que justifique su uso terapéutico y que de este modo pase de un nivel de práctica tradicional, a uno de práctica experimental, ya que no solo es un paso determinante en el proceso de transformación de una sustancia en una mercancía, sino que también es un asunto de interés público debido a que no se conocen los posibles efectos no solo terapéuticos, si no también tóxicos que pueda presentar, además de que una gran parte de la población recurre a estos tratamientos por ser más económicos.

3. HIPÓTESIS

La mezcla CPAA-MX (compuesto de plantas con actividad antidiabética de la ciudad de México) ha sido utilizada empíricamente por la población mexicana durante años. Considerando las propiedades farmacológicas de cada una de las plantas utilizadas de las cuales la mayoría poseen actividad antidiabética, se espera encontrar la actividad hipoglucemiante en el extracto etanólico CPAA-MX, al compararlo contra dos fármacos de referencia (Glibenclamida y Tolbutamida) los cuales tienen dos diferentes efectos como hipoglucemiantes (pancreáticos y extrapancreáticos), se espera que el compuesto se comporte como alguno de ellos en un modelo de ratones CD1.

4. OBJETIVOS

4.1 General

- Evaluar la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico CPAA-MX en un modelo de ratones CD1 hiperglucémicos a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg.

4.2 Específicos

- Obtener el extracto etanólico del compuesto CPAA-MX
- Inducir la hiperglucemia temporal en los ratones mediante la aplicación subcutánea de glucosa al 50% (dilución 1:5.25) al inicio del ensayo y a los 60 minutos.
- Comparar la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico CPAA-MX con fármacos hipoglucemiantes de referencia (Glibenclamida y Tolbutamida).
- Evaluar la toxicidad del extracto etanólico en un modelo subagudo en ratones CD1.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Tipo de estudio

Experimental

5.2 Población de estudio

Ratones CD1

5.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

- Criterios de inclusión: Ratones macho. Peso de 20 a 40 g. Sanos y sin lesiones.
- Criterios de exclusión: Ratones hembra y/o con lesiones.
- Criterios de eliminación: Ratones que desarrollen lesiones, infecciones o muerte a lo largo del ensayo.

5.4 Variables

Independiente:

- Tratamiento
- Solución salina (control negativo)
- Extracto etanólico CPAA-MX (dosis 25, 50 y 100 mg/Kg)
- Glibenclamida (0.8 mg/kg)
- Tolbutamida (40 mg/kg)

Dependiente:

- Nivel de hiperglucemia en ratones

6. MATERIAL

6.1 Material biológico

- 36 Ratones CD1, con un peso promedio de 40 g machos.

6.2 Reactivos

- Solución glucosada al 50%
- Goma Ghatti al 1%
- Mezcla CPAA-MX (Compuesto de plantas con actividad antidiabética de la Ciudad de México)
- Agua destilada
- Solución Salina 0.85%
- Extracto etanólico de CPAA-MX
- Etanol

6.3 Fármacos

- Glibenclamida Pureza 99.2% (Laboratorios SILANES S.A DE C.V)
- Tolbutamida Pureza 99.51 % (Laboratorios SILANES S.A DE C.V)

6.4 Material de laboratorio

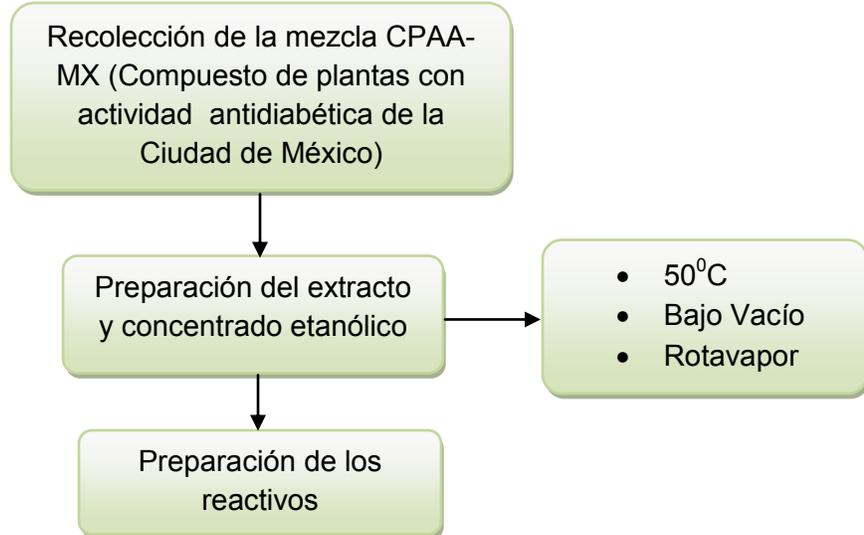
- Matraz bola 1000 ml
- Tubos de ensayo
- Sonda gástrica (Animal feeding needles, 20GX 1-1/2" Poper and Sons. Inc Newhyde Park, NJ, USA)
- Espátula de acero inoxidable
- Matraz Erlenmeyer de 2 lt
- Cajas Petri

- Estuche de disección
- Vaso de Precipitados de 10, 50 y 100 ml.
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 10 ml.
- Embudo Buchner
- Jeringas de 10 ml
- Jeringas de insulina
- Gasas
- Termómetro
- Horno de microondas
- Estufa
- Bomba de alto vacío
- Vortex
- Glucómetro AccuCheck® Performa

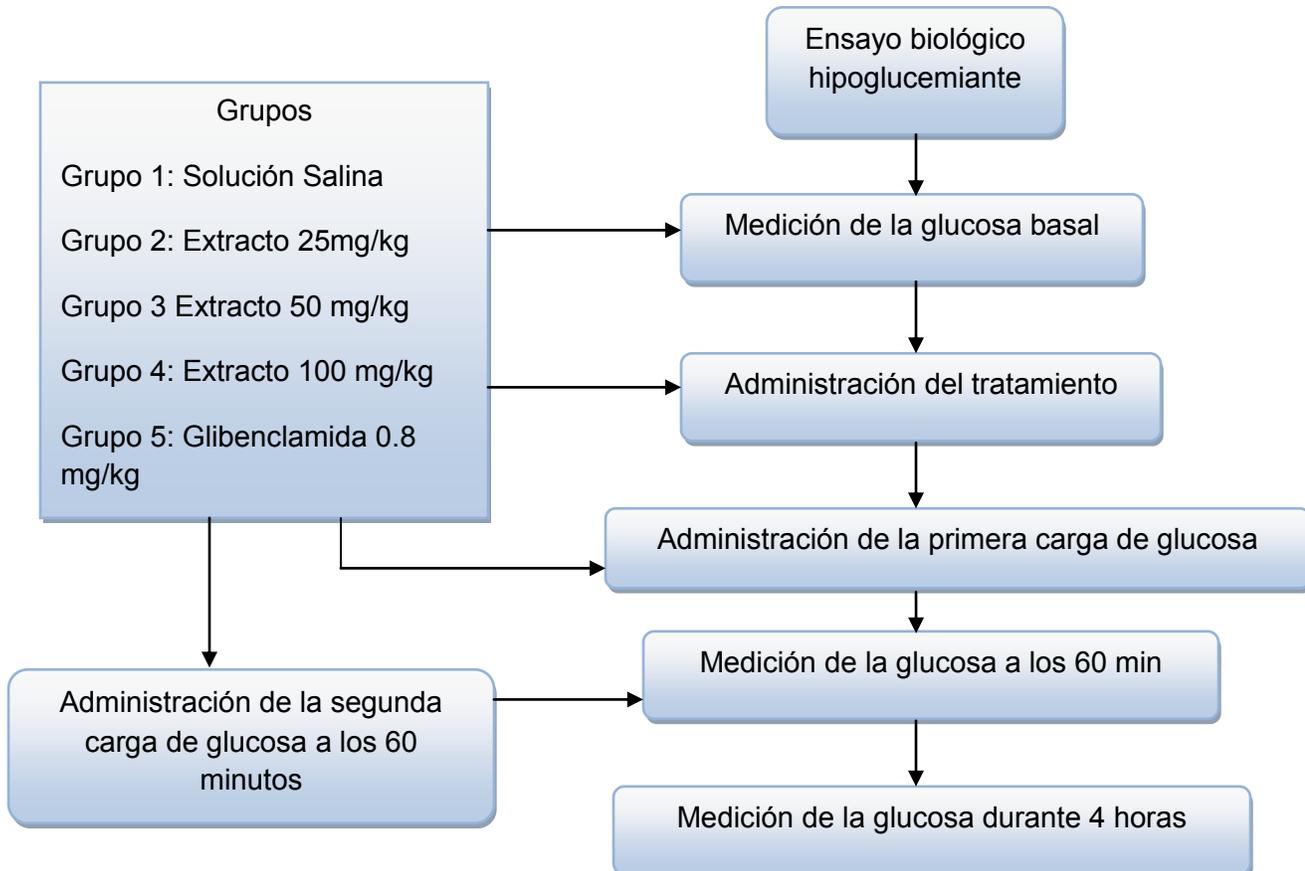
7. MÉTODOS

DIAGRAMA DE FLUJO

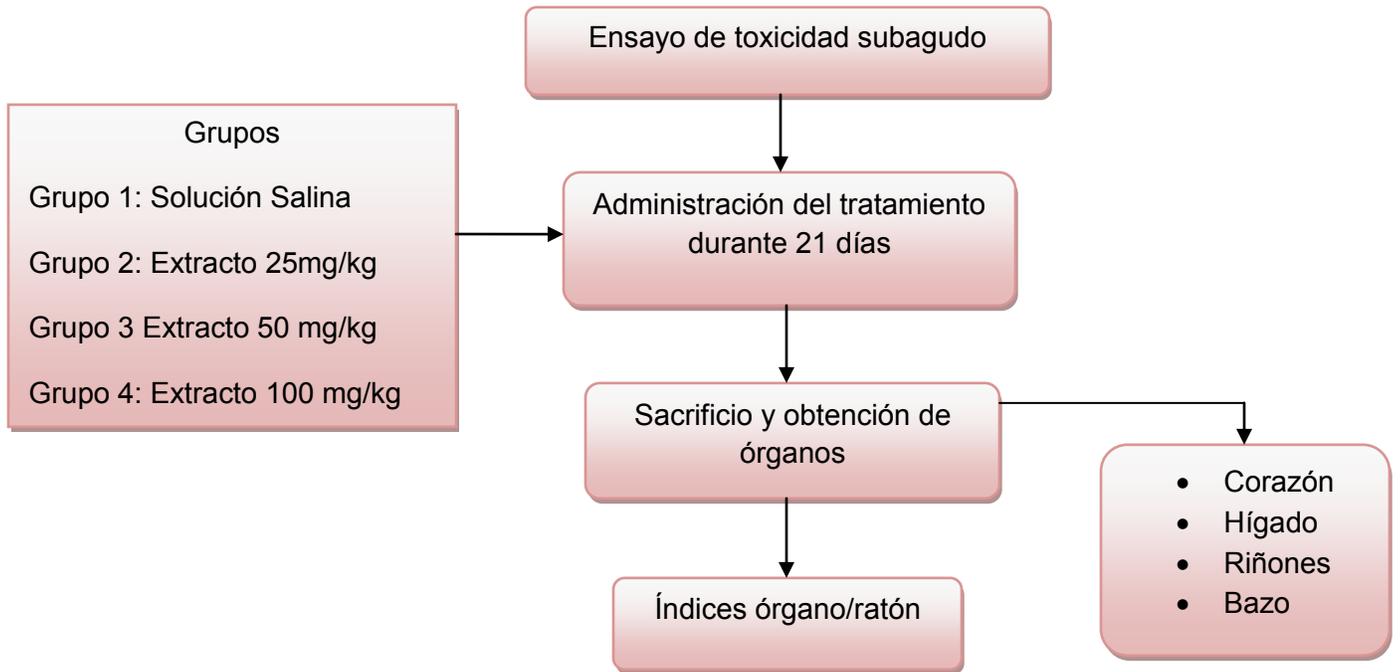
1. Recolección de la mezcla y elaboración del extracto etanólico.



2. Ensayo biológico hipoglucemiante



3. Ensayo de toxicidad subagudo



7.1 Preparación del extracto

1. Se tomó una cantidad de aproximadamente 500 g de la mezcla de plantas en estado sólido, se homogenizó lo mayor posible para obtener una cantidad lo más equitativa posible.
2. La mezcla homogénea se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2 L con tapón, se le colocó etanol hasta completar el volumen, se dejó reposar durante 72 horas evitando la exposición a la luz.
3. Posteriormente la mezcla se filtró por gravedad y vacío utilizando gasas y papel filtro.
4. Una vez filtrado el extracto etanólico, se eliminó el disolvente a rotavapor (50 °C), obteniendo un concentrado con el mínimo de humedad.
5. El concentrado se colocó en una caja Petri y se puso a secar en la estufa a 37°C durante 2 semanas.
6. Se retiró el extracto seco y se pulverizó en un mortero, se pesó para obtener el rendimiento del extracto etanólico de CPAA-MX. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta su uso.⁴⁰

7.2 Preparación de reactivos

Se prepararon el mismo día de uso que se realizó el ensayo biológico.

1. Para el grupo de control se utilizó solución salina en concentración 0.85% como tratamiento.

2. Para los controles positivos, se prepararon suspensiones de goma Ghatti al 1% calentando en ciclos de 10 a 15 segundos en el horno de microondas. En esta se disolvieron dos fármacos hipoglucemiantes de referencia: Glibenclamida (dosis 0.8 mg/kg) y Tolbutamida (Dosis 40 mg/kg).⁴¹
3. Se preparó una suspensión inicial del extracto CPAA-MX a una dosis de 100mg/kg y se realizó una dilución 1:2 para obtener la dosis de 50 mg/kg, de esta última se realizó la misma dilución para obtener la dosis de 25mg/kg conformando la dosis de los grupos experimentales.
4. Al mismo tiempo se realizó una dilución 1:5.25, con 1ml de solución glucosada al 50% (dosis 2g/kg) y 5.25 ml de Solución Salina. Se administró al tiempo 0 y a los 60 minutos (tiempo 1), durante el ensayo biológico para la inducción de la hiperglucemia.^{40, 42}

7.3 Ensayo hipoglucemiante

Procedimiento

La atención de los animales y el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y manejo de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-200-199).

1. Los ratones se sometieron a un periodo de ayuno de 16 horas antes del ensayo. Los 36 ratones se distribuyeron al azar y se dividieron en 6 grupos de 6 animales, se marcaron y se pesaron individualmente cada ratón, conformando los siguientes grupos:

Numero de grupo	Nombre del grupo/tratamiento/dosis
1	Solución salina (testigo negativo)
2	Extracto etanólico CPAA-MX (25mg/kg)
3	Extracto etanólico CPAA-MX (50 mg/kg)
4	Extracto etanólico CPAA-MX (100 mg/kg)
5	Control positivo Glibenclamida (0.8 mg/kg)
6	Control positivo Tolbutamida (40 mg/kg)

2. Se midió la glucosa basal al tiempo 0, por un corte de la parte distal de la cola para obtener la muestra de todos los grupos, utilizando un glucómetro Accu-Check® Performa.
3. Se administró con la ayuda de una sonda por vía oral los diferentes tratamientos, para el grupo 1 se administró un volumen constante de 0.2 ml de solución salina 0.85%. Para los grupos experimentales se administraron los volúmenes calculados del extracto etanólico CPAA-MX para la dosis de 25, 50 y 100 mg/kg al grupo 2, 3 y 4 respectivamente. Posteriormente se administraron los volúmenes calculados de Glibenclamida (0.8 mg/kg) y Tolbutamida (40mg/kg), al grupo 5 y 6 respectivamente.
4. Una vez administrados los tratamientos, se administró la primera carga de glucosa de una solución salina al 50% diluida 1:5.25 vía subcutánea con una dosis de 2g/kg, repartida en dos dosis con un intervalo de tiempo de 1 hora, a todos los grupos al tiempo 0 para la inducción de hiperglucemia.
5. Se midió la glucosa al tiempo 1, 2, 3 y 4 (60, 120, 180 y 240 minutos)

respectivamente) para todos los grupos.

6. Con los resultados se buscó comparar el efecto del extracto a sus diferentes concentraciones, el control positivo son los dos fármacos hipoglucemiantes y la solución salina es el control negativo.
7. Los resultados se analizaron mediante una ANOVA con una confianza al 95% para buscar diferencias estadísticas.^{40,43}

7.4 Ensayo de toxicidad sub-aguda

La atención a los animales y el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199).

Procedimiento

1. Se distribuyeron 24 ratones CD1 formando 4 grupos de seis animales cada uno, se pesaron y se marcaron los ratones conformando los siguientes grupos:

Numero de grupo	Nombre del grupo/tratamiento/dosis
1	Grupo control-Solución salina
2	Grupo experimental extracto (dosis 25mg/kg de peso)
3	Grupo experimental extracto (dosis 50mg/kg de peso)
4	Grupo experimental extracto (dosis 100mg/kg de peso)

2. Se administró por sonda gástrica los volúmenes calculados de las diferentes dosis (25, 50 100 mg/kg) del extracto etanólico CPAA-MX durante 21 días.

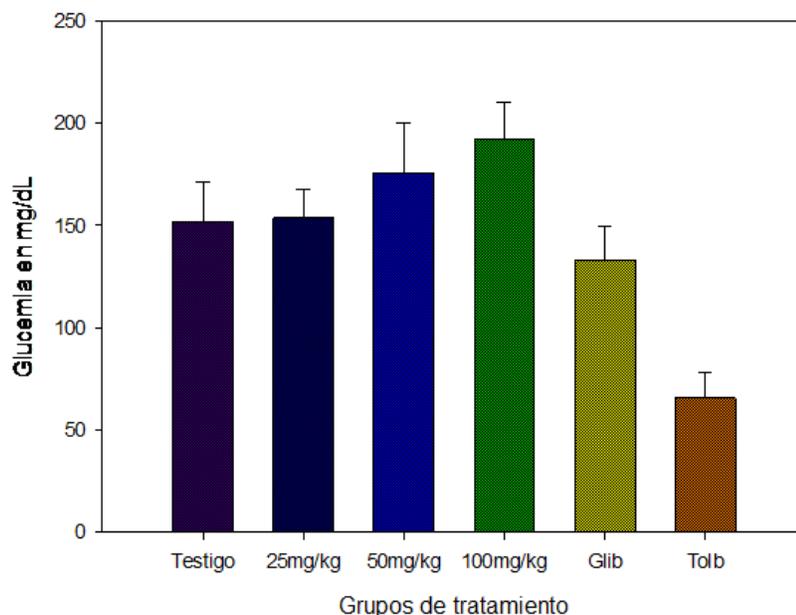
3. Se observaron los ratones diariamente para identificar alguna anomalía corporal y de comportamiento, se pesaron para observar algún cambio en el peso corporal de cada ratón.
4. Después de los 21 días se pesaron los ratones una última vez antes de realizar el sacrificio de estos.
5. Se sacrificaron los animales por medio de un corte en el plexo axilar con la previa anestesia de éter.
6. Se extrajeron los órganos: Corazón, hígado, riñones y bazo. Se pesaron cada uno de ellos para obtener la relación de peso órgano/ratón.
7. Por medio del programa estadístico SPSS se realizó un análisis ANOVA para identificar diferencias significativas entre las medias de los índices.^{40,42,43}

8. RESULTADOS

8.1 Ensayo hipoglucemiante

Se realizaron los tratamientos correspondientes para cada grupo, el grupo testigo fue tratado con solución salina, los grupos 2, 3 y 4 se trataron con el extracto a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg respectivamente, mientras que los grupos 5 y 6 fueron tratados con los fármacos hipoglucemiantes de referencia; glibenclamida y tolbutamida al tiempo 0. Pasados 60 minutos se observó el efecto de los grupos tratados (gráfica 8.1.1). Se realizó la prueba de contrastes ortogonales de Tukey (tabla 8.1.1) para observar los subconjuntos para los grupos tratados mostrando el nivel de significancia entre ellos.

Gráfica 8.1.1. Se observan los grupos de tratamiento del extracto comparados con el testigo control negativo) y los fármacos de referencia (control positivo) a los 60 minutos del ensayo.



Gráfica 8.1.1. Tiempo 1 (60 min) los valores representan la media +/- la desviación estándar. P=0.000 NS.

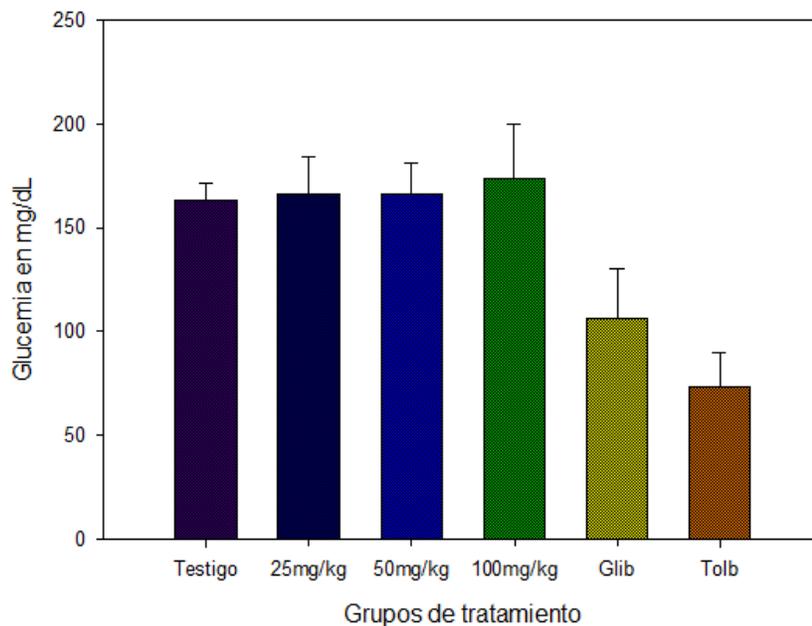
Tabla 8.1.1. Prueba Post hoc de Tukey a los 60 minutos del ensayo.

Tiempo 1					
HSD de Tukey					
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Tolbutamida 40mg/kg	5	65.6000			
Glibenclamida 0.8mg/kg	5		133.0000		
Solución Salina	6		151.8333	151.8333	
Extracto 25mg/kg	5		153.6000	153.6000	
Extracto 50mg/kg	5			175.8000	175.8000
Extracto 100mg/kg	6				192.0000
Sig.		1.000	.438	.279	.682

Tabla 8.1.1. Resultados de la prueba post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 1 (60 min).

Al administrar una segunda carga de glucosa a los 120 minutos, solo se observó el comportamiento de los grupos tratados, comparados con el comportamiento del grupo testigo de Solución Salina (Grafica 8.1.2). Se realizó la prueba de contrastes ortogonales de Tukey, la tabla 8.1.2 muestra los subconjuntos de los grupos tratados, mostrando el nivel de significancia entre ellos.

Gráfica 8.1.2. Se observan los grupos de tratamiento del extracto comparados con el testigo control negativo) y los fármacos de referencia (control positivo) a los 120 minutos del ensayo.



Gráfica 8.1.2 Tiempo 2 (120 min) los valores representan la media +/- la desviación estándar. P=0.000 NS.

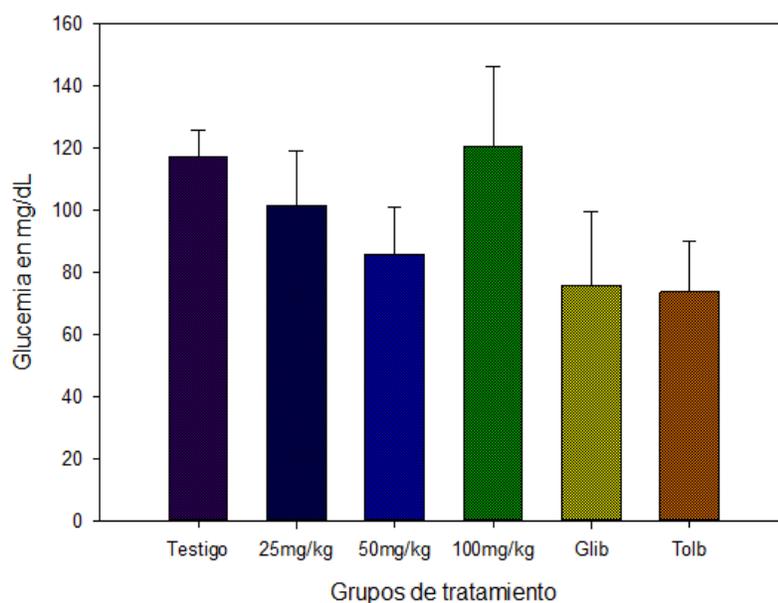
Tabla 8.1.1. Prueba Post hoc de Tukey a los 120 minutos del ensayo.

Tiempo 2			
HSD de Tukey			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tolbutamida 40mg/kg	5	73.6000	
Glibenclamida 0.8mg/kg	5	108.2000	
Solución Salina	6		183.3333
Extracto 50mg/kg	5		186.0000
Extracto 25mg/kg	5		186.2000
Extracto 100mg/kg	6		174.0000
Sig.		.085	.937

Tabla 8.1.1 Resultados de la prueba post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 2 (120 min).

Continuamos el estudio al tiempo 3 (180 minutos) para observar el comportamiento de los grupos de tratamiento comparados con el testigo negativo de solución salina a este tiempo (gráfica 8.1.3). La tabla 8.1.3 muestra la formación de los subconjuntos, así como los niveles de significancia para los grupos tratados al tiempo de 180 minutos.

Gráfica 8.1.3. Se observan los grupos de tratamiento del extracto comparados con el testigo control negativo) y los fármacos de referencia (control positivo) a los 180 minutos del ensayo.



Gráfica 8.1.3 Tiempo 3 (180 min) los valores representan la media +/- la desviación estándar. P=0.000 NS.

Tabla 8.1.3. Prueba Post hoc de Tukey a los 180 minutos del ensayo.

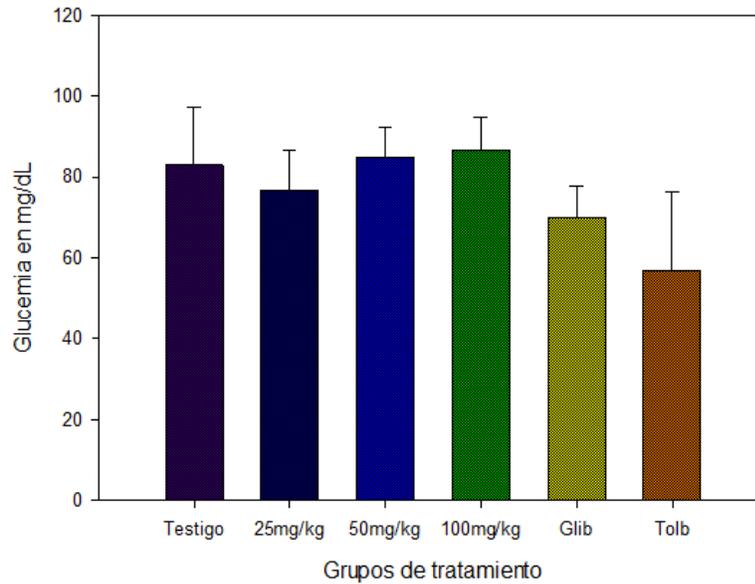
Tiempo 3
HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
		1	2	3
Tolbutamida 40mg/kg	5	63.0000		
Glibenclamida 0.8mg/kg	5	75.6000	75.6000	
Extracto 50mg/kg	5	85.8000	85.8000	
Extracto 25mg/kg	5		101.4000	101.4000
Solución Salina	6			117.1667
Extracto 100mg/kg	6			120.3333
Sig.		.150	.077	.315

Tabla 8.1.3. Resultados de la prueba post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 3 (180 min).

A los 240 minutos (tiempo 4) la gráfica 8.1.4 nos muestra como se alcanzan los niveles de glucosa basal para los grupos tratados con el extracto y como el efecto hipoglucemiante de los fármacos de referencia aún continúan su efecto. La tabla 8.1.4 muestra la formación de subconjuntos para el tiempo 4 (240 minutos) de tratamiento, así como el nivel de significancia.

Gráfica 8.1.4. Se observan los grupos de tratamiento del extracto comparados con el testigo control negativo) y los fármacos de referencia (control positivo) a los 240 minutos del ensayo.



Gráfica 8.1.4 Tiempo 4 (240 min) los valores representan la media +/- la desviación estándar. P=0.003 NS.

Tabla 8.1.4. Prueba Post hoc de Tukey a los 240 minutos del ensayo.

Tiempo 4			
HSD de Tukey			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tolbutamida 40mg/kg	5	56.8000	
Glibenclamida 0.8mg/kg	5	70.0000	70.0000
Extracto 25mg/kg	5	76.6000	76.6000
Solución Salina	6		83.0000
Extracto 50mg/kg	5		84.8000
Extracto 100mg/kg	6		86.5000
Sig.		.109	.249

Tabla 8.1.4 Resultados de la prueba post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 4 (240 min).

8.2 ENSAYO DE TOXICIDAD SUBAGUDA

Se realizó la evaluación del ensayo de toxicidad subaguda después de 21 días de administración de las diferentes concentraciones del extracto a los grupos experimentales. Se procedió a obtener el índice de peso relativo para cada ratón con el fin de conseguir datos para analizar estadísticamente. Las tablas 8.2.1 y 8.2.2 muestran la prueba Post hoc de Tukey para el Corazón e hígado respectivamente, con su respectiva significancia.

Tabla 8.2.1. Prueba Post hoc de Tukey de peso relativo para el corazón.

Pr Corazón

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Extracto 25mg/kg	5	.445400
Extracto 100mg/kg	6	.449200
Extracto 50mg/kg	5	.472940
Solución Salina	6	.475100
Sig.		.763

Tabla 8.2.1 Resultados de la prueba Post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la prueba de toxicidad subaguda en corazón.

Tabla 8.2.2. Prueba Post hoc de Tukey de peso relativo para el hígado.

Pr Hígado

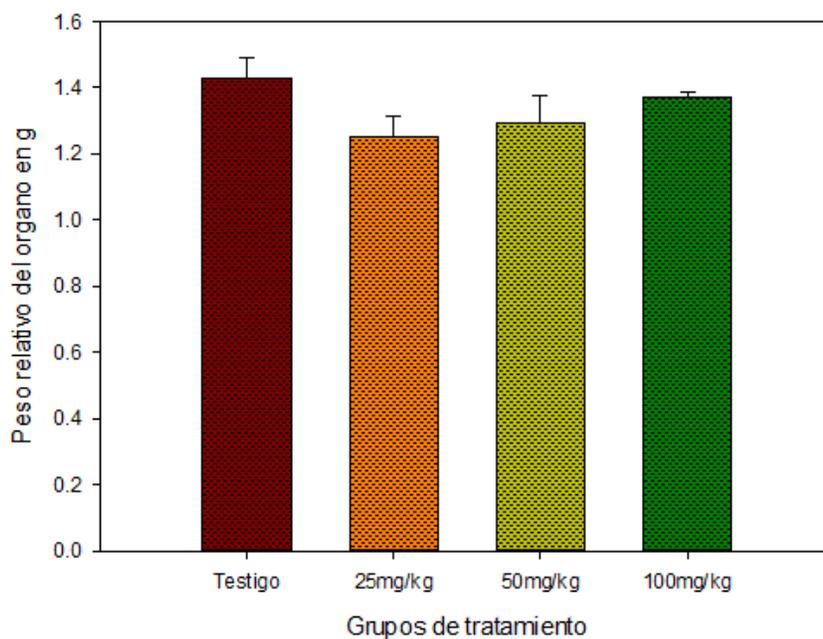
HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Extracto 25mg/kg	5	6.081400
Extracto 50mg/kg	5	6.093960
Extracto 100mg/kg	6	6.174667
Solución Salina	6	6.236683
Sig.		.926

Tabla 8.2.2 Resultados de la prueba Post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la prueba de toxicidad subaguda en hígado.

Al realizar el análisis estadístico para cada órgano, el único que muestra una ligera diferencia es el riñón (Gráfica 8.2.3), a comparación de los otros órganos, solo en este se observa un cambio en el tamaño final del órgano. Se realizó la prueba Post hoc de Tukey (Tabla 8.2.3) para observar la formación de subconjuntos y la significancia de estos valores. Se realizó además la prueba para el bazo con el fin de encontrar diferencias estadísticas (Tabla 8.2.4).

Gráfica 8.2.3. Comparación entre los grupos de tratamiento a las diferentes dosis contra el testigo negativo (solución salina).



Gráfica 8.2.3 Peso relativo en riñón los valores representan la media +/- la desviación estándar. P=0.483 NS.

Tabla 8.2.3. Prueba Post hoc de Tukey para el riñón.

Pr Riñones			
HSD de Tukey			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Extracto 25mg/kg	5	1.254560	
Extracto 50mg/kg	5	1.291640	1.291640
Extracto 100mg/kg	6	1.343567	1.343567
Solución Salina	6		1.429800
Sig.		.372	.081

Tabla 8.2.3. Resultados de la prueba Post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la prueba de toxicidad subaguda en riñones.

Tabla 8.2.4. Prueba Post hoc de Tukey de peso relativo para el bazo.

Pr Bazo

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Extracto 50mg/kg	5	.303900
Extracto 25mg/kg	5	.312600
Solución Salina	6	.334200
Extracto 100mg/kg	6	.371417
Sig.		.659

Tabla 8.2.4. Resultados de la prueba Post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la prueba de toxicidad subaguda en bazo.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para el correcto estudio del principio activo con actividad hipoglucemiante, se requiere evaluar en animales con páncreas funcional y sano. Es por esa razón que para este experimento, se siguió un modelo de animales hiperglucémicos y no un modelo donde se daña al páncreas con diversas sustancias como lo son la alloxana o la estreptozotocina, los cuales se utilizan como modelos de diabetes insulino-pénica. Para realizar este modelo, se utilizaron dos hipoglucemiantes orales, que son la Glibenclamida y la Tolbutamida, el primero con acción principal sobre páncreas utilizados en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. Y el segundo con acción principal sobre la gluconeogénesis.

Para realizar el ensayo biológico fue necesario inducir la hiperglucemia a los ratones por medio de una carga de glucosa vía subcutánea, de esta forma se evitaba dañar el páncreas y así evaluar la actividad hipoglucemiante de cada uno de los tratamientos administrados con el fin de observar los cambios en la glucemia a lo largo del ensayo.

Se analizaron los resultados por medio de un análisis estadístico ANOVA, utilizando el programa SPSS versión 21.0 y se realizó una prueba de contrastes ortogonales (post hoc) de Tukey.

Al tiempo 0 no se presentan diferencias estadísticas significativas a una $P \geq 0.05$ de los niveles de glucemia puesto que es la glucosa basal lo que se media. Sin embargo como se muestra en la gráfica 8.1.1 al tiempo 1 (60 min), los niveles de glucosa se elevan para los grupos del extracto de 50 y 100 mg/kg, para el tiempo 2 (120 min) la actividad hiperglucemiante continua para el grupo de 100 mg como se muestra en la gráfica 8.2.2. En el tiempo 3 (180 min) se termina el efecto hiperglucemiante del compuesto y comienza a disminuir la glucosa a su estado basal. La gráfica 8.1.4 nos muestra como los grupos de tratamiento alcanzan los niveles de glucosa basal a excepción de la Glibenclamida y la Tolbutamida las cuales continúan con su efecto hipoglucemiante.

En la prueba de contrastes ortogonales (*Post Hoc*) de Tukey, se observó que al tiempo 1 (tabla 8.1.1), existe la separación de 4 subconjuntos, el primero y el segundo engloban a la Tolbutamida, el segundo engloba a la Glibenclamida, la solución salina y el extracto a 25mg/kg, esto se interpreta que el aumento o disminución de glucosa es igual o similar para estos grupos de tratamiento. Sin embargo, al analizar el 3er subconjunto, se observa que este engloba la solución salina, el extracto a dosis de 25 y 50 mg. Se aprecia como en lugar de disminuir la glucosa como lo hacen los grupos control (Glibenclamida y Tolbutamida), aumentan los niveles de esta aun mayor que el control negativo (Solución salina).

Para el subconjunto 4 este solo engloba al extracto a una dosis de 50 y 100 mg/kg, en este observamos como a esas dosis y en este tiempo, la glucosa se eleva a una concentración más alta que el control negativo, sobre todo la concentración de 100 mg/kg. El hecho de que estas dos concentraciones se encuentren en el mismo subconjunto, se interpreta que se comportan de manera similar al menos en este tiempo (primeros 60 min).

La concentración de 50 mg/kg al tiempo 1 llama la atención debido a que se comporta de manera similar a un hiperglucemiante. La diferencia de medias respecto al control negativo es significativa para este tiempo, sin embargo pierde el efecto al siguiente tiempo (120 min), donde se comporta como la concentración de 25 mg/kg y el control negativo (solución salina).

La dosis de 100 mg/kg destaca por presentar actividad hiperglucemiante en los tiempos 1, 2 y 3. Sugiere un comportamiento contrario al esperado, al igual que la concentración de 50 mg/kg, presenta actividad hiperglucemiante y no hipoglucemiante.

A pesar de que al tiempo 2 (120 min) la capacidad hiperglucemiante del compuesto a esa dosis comienza su descenso, esta sigue apareciendo en el siguiente tiempo (180 min). Es posible que la dosis de 100 mg no sea suficiente para continuar el efecto hiperglucemiante ya que como se muestra en la tabla 2 y 3, la actividad decrece rápidamente en comparación con el efecto inicial. Cabe resaltar que las medias están aumentadas a la concentración de 25 mg/kg, pero no llegan a diferenciarse completamente del control negativo.

No se realizaron mediciones de glucemia al tiempo 5 debido a que el ayuno fue de 16 horas. Al realizar el ensayo de toxicidad subagudo se analizaron los índices de peso relativo de cuatro órganos: Corazón, hígado, riñones y bazo. Se analizaron por medio de un análisis estadístico ANOVA, no se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$), entre las medias de los índices de los órganos analizados, sólo en el riñón se observa un cambio en el tamaño comparado con el riñón de los testigos, se observa que hay una diferencia en las medias y una disminución en el tamaño en los grupos de tratamiento, esto puede deberse a que varias de las plantas que componen la mezcla, tienen actividad antidiurética, por lo que eso explica que exista una variación en el peso, pues este presenta una ligera deshidratación comparado con los riñones del testigo negativo en peso húmedo.

Al observar los resultados, se interpreta que el extracto etanólico CPAA-MX no presenta toxicidad en estos órganos en ninguna de sus tres concentraciones (25, 50 y 100 mg/kg) y que la ligera variación en el riñón se debe a la actividad antidiurética de la mezcla.

10. CONCLUSIÓN

Se obtuvo el extracto etanólico de la mezcla denominada como CPAA-MX (Compuesto de plantas con actividad antidiabética de la Ciudad de México) obteniendo un rendimiento del 1.21%, las diferencias estadísticas significativas encontradas en el ensayo demuestran que el extracto etanólico de CPAA-MX, tiene actividad hiperglucemiante y no hipoglucemiante a la dosis de 50 y 100 mg/kg a los primeros 60 minutos. Por lo tanto no se recomienda para su uso en el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2, ya que en lugar de presentar una mejora frente a la enfermedad, puede empeorar el problema y poner en riesgo la vida del paciente.

En el ensayo de toxicidad subaguda los animales no mostraron una anomalía relevante en los órganos analizados a ninguna de las tres concentraciones (25, 50 y 100 mg). En el tratamiento de la DM tipo 2, el uso de plantas medicinales depende en gran medida del sustento científico y a la aprobación de instituciones públicas, educativas y de investigación para así poder facilitar además de la información, la confiabilidad para seguir esta práctica cotidiana sin riesgos y con mayor seguridad.

11. PROPUESTA

- Realizar el estudio comparativo del extracto de la mezcla CPAA-MX en medio acuoso.
- Realizar el ensayo comparativo con la dosis de 50 mg como la más baja ya que a partir de esta se presentó la actividad hiperglucemiante.
- Realizar un estudio inverso con la inducción de hipoglucemia en ratones y administrar el extracto para observar si el nivel de glucosa basal se restablece o aumenta.

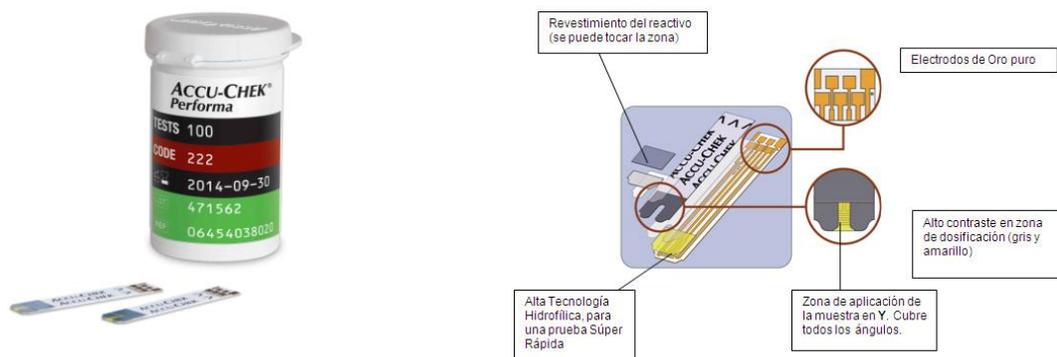
12. ANEXOS

12.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

1. Se inmovilizará a los ratones dentro de un cilindro de plástico, el cual tiene en el extremo un orificio por donde se expone la cola del ratón.
2. Con la ayuda de unas tijeras quirúrgicas se hace un pequeño corte en la parte distal de la cola y se obtiene una gota de sangre.⁴⁰

12.2 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA CON EL GLUCÓMETRO ACCUCHEK® PERFORMA

1. Se utiliza un frasco nuevo de tiras reactivas y se introduce un chip de calibración único que viene dentro del frasco y se introduce en el glucómetro para calibrarlo.



2. Se extrae una tira reactiva del frasco y se cierra herméticamente el frasco.

- 3, Se inserta el extremo dorado de la tira en la ranura de tiras del medidor, este encenderá automáticamente y aparecerá en la pantalla el número del código del frasco.
4. Se debe asegurar que el código que se encuentra en el medidor, coincide con el código en el frasco de tiras reactivas.
5. Cuando se observe la imagen de una gota parpadeando en la pantalla del medidor, se acerca la gota de sangre al extremo amarillo de la tira y se impregna una pequeña cantidad sobre ella.
6. En la pantalla del glucómetro aparecerá un reloj de arena lo cual significa que la está procesando, en caso de no aparecer, significa que la cantidad de sangre no fue suficiente para poder procesarla, se tienen 5 segundos para repetir el proceso.
7. Una vez que se ha medido exitosamente la muestra, se extrae la tira reactiva y se desecha.
8. Se utiliza una tira reactiva por cada muestra a medir.

12.3 DESCRIPCIÓN DEL GLUCÓMETRO ACCUCHECK® PERFORMA

12.3.1 Determinación de glucosa; Principio de la prueba

En presencia de la coenzima (PQQ) la enzima de la tira reactiva, glucosa deshidrogenasa, convierte la glucosa de la muestra de sangre en gluconolactona. Esta reacción crea una corriente eléctrica CC inofensiva que su medidor interpreta para un valor de glucemia. La muestra y las condiciones medioambientales se evalúan usando una pequeña señal CA.

El envase que contiene las tiras reactivas reúne los requisitos máximos de seguridad y de comodidad para el traslado y manipulación.

Las tiras reactivas AccuCheck Performa han sido diseñadas con una tecnología inteligente que permite detectar y corregir influencias externas como temperatura, humedad, daño de la tira reactiva o muestras insuficientes de sangre, evitando que estos factores intervengan en el resultado.

12.3.2 Finalidad de uso

Tiras reactivas para pruebas cuantitativas de glucemia en sangre capilar, arterial o neonatal fresca así como en sangre venosa anti coagulada con heparina de litio, sodio o EDTA. El rango de medición es de 10-600 mg/dl.

12.3.3 Especificaciones del medidor AccuCheck® Performa

- Pantalla LCD
- Apagado automático: Después de 2 minutos
- Suministro de energía: Pila de litio CR-2032
- Rango de medición: 10-60 mg/dL
- Tamaño de muestra: 0.6 µL
- Tiempo de medición: Aproximadamente 5 segundos
- Condiciones de operación del sistema: 6 a 44 C°; 10 a 90% de humedad relativa.
- Condiciones de almacenamiento del medidor: De -40 a 70°C
- Rango de humedad relativa para operación: Menos del 85%

- Altitud: < 10, 150 pies de altura
- Capacidad de memoria: 500 valores de glucosa en sangre con hora y fecha, promedios semanales, quincenales y mensuales.
- Dimensiones: 93 x 52 x 22 mm (Largo, ancho y alto)
- Peso: 62 g con pila incluida ⁴¹

Anexo 2

Tabla 2.1 ANOVA para el ensayo biológico hipoglucemiante

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
tiempo0	Inter-grupos	297.985	5	59.597	1.344	.277
	Intra-grupos	1152.733	26	44.336		
	Total	1450.719	31			
tiempo1	Inter-grupos	50764.935	5	10152.987	31.827	.000
	Intra-grupos	8294.033	26	319.001		
	Total	59058.969	31			
tiempo2	Inter-grupos	44433.867	5	8886.773	25.186	.000
	Intra-grupos	9174.133	26	352.851		
	Total	53608.000	31			
tiempo3	Inter-grupos	14422.508	5	2884.502	13.481	.000
	Intra-grupos	5563.367	26	213.976		
	Total	19985.875	31			
tiempo4	Inter-grupos	3346.575	5	669.315	4.713	.003
	Intra-grupos	3692.300	26	142.012		
	Total	7038.875	31			

Tabla 2.2 ANOVA para el ensayo de toxicidad subagudo.

ANOVA de un factor						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Corazón	Inter-grupos	.048	5	.010	1.571	.203
	Intra-grupos	.160	26	.006		
	Total	.208	31			
Hígado	Inter-grupos	.607	5	.121	.172	.971
	Intra-grupos	18.381	26	.707		
	Total	18.989	31			
Riñones	Inter-grupos	.193	5	.039	.921	.483
	Intra-grupos	1.090	26	.042		
	Total	1.283	31			
Bazo	Inter-grupos	.137	5	.027	2.149	.091
	Intra-grupos	.331	26	.013		
	Total	.468	31			

13. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. México: OMS; 2014. [Consultado el 14 de mayo de 2014]. Disponible en:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf?ua=1&ua=1

2. González EM, López EIL, González EMS, Tena FJA. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. [Internet] México. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones Del Instituto Politécnico Nacional; 2004: 11-32 [Consultado el 16 de mayo de 2014] Disponible en:

<http://www.libros.publicaciones.ipn.mx/PDF/1490.pdf>

3. Ocegueda, S. Moreno E, Kolett P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. [Internet] México. CONABIO. Rev Biodiversitas; 2005; (62): 12-15 [consultado el 28 de mayo de 2014] Disponible en:

<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>

4. Osorio DEJ. Aspectos básicos de la farmacognosia. [Internet] México. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Colombia 2009 [Consultado el 8 de junio de 2014] Disponible en:

<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/farmacognosia.pdf>

5. Kinghorn D. Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001; 53: 135-148.

6. Oubre AY, Carlson TS, King SR, Reaven GM. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDMM. *Diabetologia*. 1997; 40: 614-617.

7. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 99: 325-348.

8. Plantas medicinales de México [Internet]. 2014 [Consultado el 17 de junio de 2014]. Disponible en:

<http://plantasdemexico.blogspot.mx.html>

9. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. 2^{da} edición. México: Secretaria de Salud; 2013.

10. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 11^{va} edición. México: Secretaria de Salud; 2014.

11. Argueta A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana [Internet] México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; 2009 [Consultado el 21 de junio de 2014] Disponible en

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>

12. García de Alba JE, Ramírez Hernández BC, Robles Arellano G, Zañudo Hernández J, Salcedo Rocha AL, García de Alba Verduzco JE. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. México. Rev Desacatos. 2012: 29-44

13. Bello González MA, Salgado Garciglia R. Plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. Rev Biológicas. 2007, 9: 126-138.

14. SIB. Catálogo de especies [Internet]. México; 2014 [Consultado el 28 de Agosto de 2014]. Disponible en:

<http://www.sibcolombia.net/web/sib/home>

15. A. Saravana Kumar, S. Kavimani, K.N. Jayaveera. A review on medicinal plants with potential antidiabetic activity. International Journal of Phytopharmacology. 2005; 99: 325-348.

16. Kavishankar, N. Lakshmidari, S. Mahadeva, et al. Diabetes and medicinal plants-A review. Pharma Inter Science Publishers. 2011; 2: 65-80.

17. Parham P. El sistema inmune. 3ra Edición. México: Editorial El manual moderno; 2011; 21-28.

18. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

19. Herráez V, Herranz R, López M. ¿Qué es un modelo animal? .Gaceta óptica. 2004; (382): 20-24.

- 20.** Altamirano A. Manual para manejo de animales de laboratorio. México: UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 1994. 96-97 p.
- 21.** Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. Estudios de Toxicidad pre-clínicos y clínicos. 2008.
- 22.** Camilo Torres Serna. Estrategias para la investigación en farmacología clínica. Colombia. [Internet] 2008 [Consultado el 21 de Enero de 2015]. Disponible en: www.catorsescs.com%2Finstituto%2Ftemas_apoyo%2FInvestigacionFarmacologica.pdf
- 23.** Ganong WF. Fisiología Médica. 23^a ed. México. Editorial McGrawHill; 2010: 315-335.
- 24.** Gerard J Tortora, Bryan Derrickson. Principios de anatomía y fisiología. 11^a ed. México: Editorial Panamericana: 2012: 931-940.
- 25.** Braun C, Anderson CM. Fisiología un enfoque clínico. 2^a edición. Barcelona: Wolters Kluwer; 2012, 470-483.
- 26.** Aguilar-Salinas, C. A. E. Reyes Rodríguez, et al. Early-onset type 2 diabetes:metabolica and genetic characterization in the Mexican population. The journal of clinical endocrinology and metabolism; 2001, 86: 220-226.
- 27.** Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. Subsecretaria de prevención y control de enfermedades de coordinación de vigilancia epidemiológica.

- 28.** Daneman, D. Type 1 Diabetes. Lancet. 2006; 367: 847-858.
- 29.** Daniel P. Stites, John D. Stobo, H. Hugh Fundenberg, Vivian Wells. Inmunología básica y clínica. México: Editorial Manual Moderno; 1995.
- 30.** Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina clínica. 6^a ed. México: McGraw-Hill. Lange. 413-437, 497-552.
- 31.** Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes. [Internet] 2011. [Consultado el 28 de Enero del 2015] Disponible en:

<http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=274>
- 32.** Diabetes Mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la encuesta nacional de salud; 2011 [Internet]; 21-28 [Consultado el 04 de Febrero del 2015] Disponible en:

http://scielo.unam.mx/scielo.php?pid=S003636342007000900004&script=sci_arttext
- 33.** Robbins R. Patología Estructural y funcional. 8^{ava} edición, España. Editorial Elsevier; 2010.
- 34.** Scott A. Waldman, Andre Terzic. Farmacología y terapéutica, principios para la práctica. México: Editorial El manual moderno, 2010, 557-570.
- 35.** Rodríguez R. Guía de Farmacología y Terapéutica. 1a ed. México. Editorial McGraw Hill; 2007.

- 36.** Chávez Ortiz R, Del Vaega RB. Hipoglucemiantes orales: Propiedades Farmacológicas y usos terapéuticos. Rev de posgrado de la cátedra Via Medicina. 2001: 8-12.
- 37.** Andrew J. Krentz and Clifford J. Bailey. Oral Antidiabetic Agents, Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. Adis Data Information. 2005; 99: 65-80.
- 38.** Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a ed. México. Editorial McGraw Hill; 2007.
- 39.** Hersh Martínez P. Medicamentos y remedios herbolarios en México: La farmacopea herbolaria y su relevancia. Congreso Encuentro científico FEUM-USP; 2014 Agosto 26-27. México DF. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2014.
- 40.** Carreón-Sánchez R, Marroquín SR, Mora GJLA, Aguilar CA, Flores CY, Flores PM, Hernández AVJ. Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria. Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas. 2013; 44(2): 41-44.
- 41.** P.R. Vademecum. [CD-ROM]. México: Informed S. A de C. V; 2012.
- 42.** Marroquín-Segura R, Flores PM, García BMM, Mora GJLA. Sánchez RJF, Aguilar CA. Efecto antihiper glucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas. 2005; 36: 27-32.

- 43.** Marroquín R, Flores M, Carreón R, García M, Mora J, Aguilar A, Hernández A. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw edema and granuloma tissue formation in mice. *J Ethnopharmacol.* 2009; 124(3):639-641.