

T
503

90860

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DE

***Psacalium peltatum* H.B.K.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Casa abierta al tiempo
PRESENTA
CLAUDIA CRISTINA CONTRERAS WEBER
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

COMITÉ TUTORAL

Director: DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Directora: DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ

Asesor: DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

MÉXICO, D.F.

**XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO**

FEBRERO DEL 2005.

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad
Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados
de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del
mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que

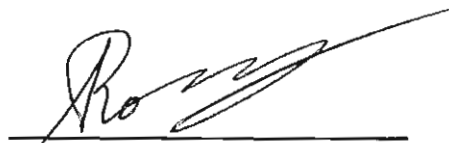
Presentó:

CLAUDIA CRISTINA CONTRERAS WEBER

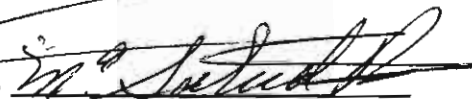
El día 14 de febrero del año 2005

Sinodales:


DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS



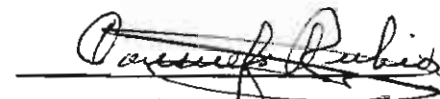
DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ



DR. FRANCISCO J. ALARCÓN AGUILAR



DRA. CONSUELO RUBIO POO



DR. ALFONSO EFAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA



COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORES DE TESIS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II

DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

ASESOR

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR

Profesor Titular "C", Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Dr. Rubén Román Ramos**, por la dirección de este trabajo, por su constante apoyo y por su continuo interés en mi superación profesional, pero sobre todo por su confianza en mí.

A la **Dra. Salud Pérez**, por su interés en el proyecto, por su enorme participación en el mismo y por su paciencia.

Al **Dr. Francisco Alarcón**, por sus acertadas observaciones y por su participación en el proyecto.

A la **Dra. Consuelo Poo** y al **Dr. Efraín Campos**, que con sus valiosas opiniones lograron enriquecer y mejorar este trabajo.

A los **Dres. Cuauhtémoc Pérez** y **Miguel Zavala** por su invaluable participación en la caracterización química y por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **DIOS**, por permitirme lograr una meta más.

A mi **Madre**, principal motor de mi vida.

A mis **Hermanos** por el gran cariño que nos une.

A la **Dra. Ruth Meléndrez**, por encaminarme por esta vía.

A los **Xochimilcas**, por los buenos y malos momentos compartidos.

A mis **4 mosqueteros**: Elías, Leo, Julia y Mundo; por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores.

Al personal residente del Laboratorio de Farmacología y de manera especial a **Laura y Erika** por su colaboración.

La presente investigación se realizó en:

La Universidad Autónoma Metropolitana

Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa.

Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Sistemas Biológicos,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Xochimilco.

I N D I C E

	Pág.
1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
Resumen	1
Abstract	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 Diabetes mellitus	5
2.1.1. Definición	5
2.1.2. Aspectos Históricos	6
2.1.3. Clasificación	9
2.1.4. Etiopatogenia	18
2.1.5. Signos y Síntomas	27
2.1.6. Diagnóstico	28
2.1.7. Tratamiento	31
2.2. Medicina tradicional (herbolaria)	36
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	45
3.1 Hipótesis	47
3.2 Objetivos	49
4. MATERIAL Y MÉTODOS	48
4.1. Material Biológico	48
4.2. Estudio farmacológico	49
4.3. Obtención y estudio farmacológico de los extractos	50
4.4. Obtención y estudio farmacológico de las fracciones primarias y secundarias	51
4.5. Extracción acuosa y aislamiento de la sustancia responsable de actividad hipoglucemiante	52
4.6. Estudio farmacológico de la peltalosa	54
4.7. Análisis estadístico	54
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1. Valoración farmacológica de las decocciones acuosas	55
5.2. Rendimiento y valoración farmacológica de los extractos	57
5.3. Rendimiento y valoración farmacológica de las fracciones primarias del extracto metanólico	59
5.4. Valoración farmacológica de las fracciones secundarias del extracto metanólico	61
5.5. Aislamiento y caracterización química de la peltalosa	62
5.6. Valoración farmacológica de la peltalosa	63
5.7. Discusión	65

6. CONCLUSIONES	71
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8. ANEXOS	81
Espectros	82
Publicación del tema de tesis	91

1. RESUMEN Y ABSTRACT

1.1. Resumen

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome provocado por la falla en la secreción y/o acción de la insulina que lleva a hiperglucemia y otros trastornos metabólicos. Actualmente, la DM representa uno de los problemas más importantes de la Medicina y es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas.

Son cuatro los factores más importantes para el control de la DM, dirigido a la desaparición de los síntomas y prevención de las complicaciones agudas y crónicas: educación del paciente en cuanto a su padecimiento, dieta, ejercicio físico y medicamentos hipoglucemiantes como la insulina y los agentes hipoglucemiantes orales (sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de las α -glucosidasas y tiazolidinedionas).

Según la OMS, más del 70% de la población acude a la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud. Investigaciones etnobotánicas reportan que a nivel mundial se utilizan más de 1200 plantas en el control empírico de la DM.

En México, la población utiliza empíricamente más de 250 plantas como antidiabéticas. De éstas, tomando en cuenta que *Psacalium peltatum* tiene amplia distribución geográfica, intenso efecto hipoglucémico a nivel experimental y que sólo ha sido estudiada la actividad farmacológica de su preparación tradicional, fue seleccionado para realizar estudios dirigidos al aislamiento e identificación de la sustancia pura, responsable de la actividad hipoglucemiante.

Después de corroborar el efecto hipoglucémico de la decocción acuosa de la raíz de *Psacalium peltatum* en ratones sanos y diabéticos, se procedió a obtener extractos utilizando disolventes de diferente polaridad y a realizar pruebas farmacológicas para detectar el o los poseedores de la actividad hipoglucemiante, que resultaron ser los extractos metanólico y acuoso. Éstos fueron posteriormente sometidos a fraccionamiento por técnicas cromatográficas con el seguimiento correspondiente de la actividad farmacológica y finalmente se aisló un nuevo compuesto tipo ulopiranososa poseedor de intensa actividad hipoglucemiante mediada por la insulina. Este compuesto, el cual fue llamado peltalosa, puede ser recomendado para el control de la diabetes mellitus tipo 2, previa investigación preclínica y clínica.

Palabras Clave: Plantas hipoglucemiantes; plantas antidiabéticas; diabetes mellitus; *Psacalium peltatum*, peltalosa.

1.2. Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a syndrome caused by the flaw in the secretion y/o action of the insulin that takes to hyperglycemia and other metabolic dysfunctions. At present, the DM represents one of the most important problems in the Medicine and it is the third cause of death, after the cardiovascular and oncological diseases.

They are four the most important factors for the control of the DM, directed to the disappearance of the symptoms and prevention of the acute and chronic complications: the patient's education for their suffering, diet, physical exercise and hypoglycemic medications like the insulin and the oral hypoglycemic agents (sulphonylureas, biguanides, inhibitors of α -glucosidases and thiazolidinediones).

According to the OMS, more than the population's 70% goes to the traditional medicine to solve their problems of health. Ethnobotanic investigations report that at world level they are used more than 1200 plants in the empiric control of the DM.

In Mexico, the population uses empirically more than 250 plants as antidiabetic. Of these, taking into account that *Psacalium peltatum* has wide geographical distribution, intense hypoglycemic effect at experimental level and the fact that the pharmacological activity of its traditional preparation has only been studied, it was selected to carry out studies directed to the isolation and identification of the pure substance, responsible for the hypoglycemic activity.

After corroborating the hypoglycemic effect of the aqueous decoction of the root of *Psacalium peltatum* in healthy and diabetic mice, it proceeded to obtain extracts using solvent of different polarity and to carry out pharmacological tests to detect the or the possessors of the hypoglycemic activity that turned out to be the methanolic and aqueous extracts. These were later on subjected to division for chromatographic techniques with the pursuit corresponding of the pharmacological activity and finally a new compound type ulopyranose was isolated, it has an intense hypoglycemic activity mediated by insulin. This compound, which peltalose was called, it can be recommended for the type 2 diabetes mellitus control, previous preclinic and clinic investigation.

Key words: Hypoglycemic plants; antidiabetic plants; diabetes mellitus; *Psacalium peltatum*; peltalose.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DIABETES MELLITUS

2.1.1. DEFINICIÓN

La diabetes mellitus (DM) se puede definir como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por un estado de hiperglucemia crónica que obedece a defectos en la secreción de insulina, resistencia a esta hormona o ambos. Además de producir trastornos en el metabolismo de carbohidratos, la enfermedad afecta el metabolismo lipídico y proteínico, causando también desequilibrio hidroelectrolítico (Taylor y Agius, 1988; Iwasaki y col., 1996). La glucemia en ayuno es igual o superior a 126 mg/dL y con frecuencia se puede detectar glucosa en la orina (Rull-Rodrigo, 1997; Committee Report, 1997, 2003).

La DM es uno de los problemas más importantes de la medicina y afecta a un alto porcentaje de la población mundial (2-10 %). En la mayoría de los países industrializados y en varios países en vías de desarrollo, entre ellos México, la DM ocupa el tercer lugar como causa de deceso, únicamente después de las enfermedades cardiovasculares y oncológicas. En México, la prevalencia de la DM oscila del 2 al 10 % de la población; de acuerdo con las predicciones de la Organización Mundial de la Salud, para el año 2025 habrá 11.7 millones de pacientes en nuestro país (King y col., 1998), en tanto que la mortalidad reportada en 1994 fue de 15.8 por cada 100,000 habitantes. Esta enfermedad y sus complicaciones incapacitantes causan un gran daño económico y social (Head y Fuller, 1990; Rodríguez-Saldaña y col., 1994; ADA, 1997; Alberti, 1997).

2.1.2. ASPECTOS HISTÓRICOS

Los egipcios en el siglo XV a. de C. describieron por primera vez en la historia de la humanidad los síntomas de la DM en los papiros de Ebers. El término diabetes proviene del vocablo dia-baino, que en griego significa "correr a través de un sifón" y fue introducido por Aretaios de Cappadocia en el año 70 a. de C., quien describió a la DM: "... como una enfermedad misteriosa y rara....los enfermos tienen una sed insaciable, pero emiten más orina que líquido toman. La extenuación muy pronto los domina, y después de una vida miserable y dolorosa, llega rápidamente la muerte..." (Lozoya, 1980).

Susruta, médico hindú, en el siglo V de nuestra era mencionó la orina melíflua, refiriéndose al carácter dulce de la orina de los pacientes diabéticos. En el siglo XIV, Paracelso escribió que cuando una medida de orina de un enfermo diabético se evaporaba, quedaba un resto con consistencia de jarabe, algo así como "cien gramos de sal"; el residuo parecía sal, pero era dulce; en esa época el azúcar blanco era desconocido. Willis afirmó en 1675 que la orina de los enfermos de diabetes tiene un sabor "como si estuviera llena de azúcar y miel". La existencia de azúcar en la orina del paciente diabético fue plenamente demostrada por Dobson en 1776 (Stocker, 1966).

En el siglo XIX se inició la época de la medicina experimental y Claude Bernard descubrió que las féculas y azúcares tomados en los alimentos se transforman en glucosa, la cual se convierte en glucógeno en el hígado, órgano que libera glucosa a la sangre para mantener de manera constante la glucemia en el organismo. Brockman, en un estudio en peces y posteriormente Langerhans en

1867 en un estudio en humanos, descubrieron que dispersos en la masa pancreática, de aspecto muy similar a las glándulas salivales, se encuentran racimos de células como pequeños islotes cuya estructura es diferente a las que producen enzimas digestivas y cuya función en ese momento no pudo ser determinada (Lozoya 1980).

Las descripciones históricas de la enfermedad por Thomas Willis, Dobson y Claude Bernard dieron importancia al padecimiento y al reconocimiento de las complicaciones.

Luego, progresivamente fueron identificándose otras alteraciones químicas en el cuerpo de los enfermos diabéticos, y en 1815, Chevreul demostró que el azúcar de la sangre de los diabéticos es idéntico al que se encuentra en las uvas, llamado químicamente glucosa. En 1845, Buchardet fue el primer investigador que relacionó la diabetes con el páncreas; Petters, en 1857, descubrió que la orina de diabéticos graves contiene acetona; Gerhard, en 1874, identificó el ácido acetoacético en la orina de estos enfermos y Kutz en 1885, identificó a su vez el ácido betahidroxibutírico; en 1886, Johann Conrad Brunner pensó que el páncreas estaba implicado en la utilización de grasas y azúcares por el organismo humano.

En 1889, los fisiólogos alemanes Von Mering y Minkowski de la Universidad de Estrasburgo, notaron que si el páncreas era eliminado en perros, el animal desarrollaba diabetes con un comienzo agudo, de curso grave y que termina con la muerte del animal en pocas semanas. Más adelante, los científicos descubrieron que aún destruyendo al páncreas, los animales no se volvían diabéticos si los islotes se preservaban (Mehring y Minkowski, 1889). Con base en estos estudios, se llegó a la conclusión de que el páncreas produce una sustancia

indispensable para el aprovechamiento de las féculas y los azúcares. Dicha sustancia fue llamada insulina mucho antes de ser descubierta (Caádel, 1973).

Utilizando la información disponible hasta el año de 1921, Banting y Best en Ontario, Canadá, desarrollaron un proyecto de investigación sobre la diabetes. El proyecto consistió en la extracción y purificación del contenido de los islotes pancreáticos, así como en la valoración biológica de los mismos en animales diabéticos. Finalmente, en diciembre del mismo año, inyectaron este material a un niño en estado de coma cetoacidótico por la diabetes y encontraron que los niveles de azúcar sanguíneo descendían, logrando salvarle la vida. Esto fue un importante evento para los miles de diabéticos en todo el mundo y señaló el principio de una nueva era en el tratamiento de la diabetes ya que de un golpe la vida sustituyó a la muerte para los miles de pacientes con diabetes (Banting y col., 1922).

Después de aislar a la insulina, pocos descubrimientos en la historia de la Diabetología han tenido tan grandes repercusiones como los trabajos experimentales realizados por estos investigadores canadienses. En 1955, Sanger dilucidó la estructura química de la insulina bovina y fue hasta 1960 que Nicol y Smith describieron la estructura química de la insulina humana. En 1963, un grupo de investigadores norteamericanos y alemanes pudieron lograr la síntesis química de la insulina (Lozoya, 1980).

Si bien estos descubrimientos fueron considerados como la solución de problemas de la diabetes, eventualmente se vio que la administración intermitente de insulina no era suficiente para normalizar el metabolismo de los pacientes diabéticos.

2.1.3 CLASIFICACIÓN

En la propia definición de la diabetes mellitus se encuentra incorporado sucintamente el concepto de que existen diferentes condiciones –de deficiencia de secreción o de acción de la insulina- que pueden dar lugar a la aparición del trastorno metabólico. Así pues, puede haber diferentes alteraciones a través de las cuales se produzca un trastorno del metabolismo de la glucosa, que origina un aumento de su concentración en la sangre y la posibilidad del desarrollo a largo plazo de complicaciones vasculares.

La clasificación muestra que existen criterios clínicos, en los que el trastorno se encuentra presente, y criterios estadísticos que son situaciones en las que el individuo metaboliza con normalidad los azúcares, pero se encuentra en alto riesgo de desarrollar alteraciones debido a su carga genética o a la concurrencia de un factor añadido desencadenante, como pueden ser la gestación y el exceso de peso (Committee Report, 1997).

La DM se clasifica como se describe a continuación:

Clasificación etiológica de la DM (Committee Report, 1997)

1. Diabetes tipo 1

a) Asociada al sistema inmune

b) Idiopática

2. Diabetes tipo 2

3. Otros tipos específicos de diabetes

a) Defectos genéticos relacionados con la función de las células β

b) Defectos genéticos en la acción de la insulina

- c) Enfermedades del páncreas exocrino
 - d) Endocrinopatías
 - e) Química o farmacológicamente inducida
 - f) Infecciones
 - g) Formas poco comunes de diabetes asociada al sistema inmune
 - h) Otros síndromes genéticos, algunas veces asociados con diabetes
4. Diabetes mellitus gestacional (DMG)

De todos los casos de DM reportados, del 5 al 10% corresponden a la DM tipo 1, del 85 al 90% a la DM tipo 2, y sólo el 2% corresponde a la diabetes secundaria (Gómez-Vargas, 1997), siendo la DM tipo 1 y la DM tipo 2 los dos tipos de DM más importantes desde el punto de vista clínico (Abourizk and Dunn, 1990; Rull-Rodrigo, 1997).

DIABETES TIPO 1

Diabetes mediada por procesos autoinmunes

Esta forma de diabetes, previamente conocida bajo diferentes denominaciones (DMID, diabetes juvenil) resulta de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas. Los marcadores de esta destrucción son los autoanticuerpos anti-células de los islotes (ICA), autoanticuerpos antiinsulina (IAA), autoanticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico (GAD) y los autoanticuerpos antitirosina fosfatasa IA-2 y IA-2B β , en su mayoría presentes en el 85-90% de los individuos cuando la hiperglucemia es detectada por primera vez. Además, esta forma de

diabetes presenta una fuerte asociación con el sistema HLA (Human Leucocyte Antigens) (Villaseñor-Ruiz, Gómez-Pérez FJ (1997).

En algunos pacientes (niños generalmente), la primera manifestación de la enfermedad es una cetoacidosis; en otras, la hiperglucemia es discreta al principio pero puede cambiar rápidamente a severa, e incluso a cetoacidosis en presencia de una infección o estrés; y algunos aún pueden conservar una secreción residual de insulina (generalmente adultos), que les previene de una cetosis durante muchos años. Obviamente, en esta forma de diabetes, los individuos necesitan de la insulina exógena para sobrevivir y persiste en ellos siempre el riesgo de cetoacidosis. En las etapas tardías de la enfermedad o no hay secreción de insulina o ésta es escasa, como puede comprobarse por los muy bajos o indetectables niveles del péptido C. Es importante saber que esta forma de diabetes, común en niños y adolescentes, puede aparecer en cualquier momento de la vida e incluso en las edades más avanzadas; obviamente también puede aparecer en obesos. Por su carácter autoinmune, los pacientes afectados son proclives a padecer otras enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Graves, el vitiligo, enfermedad de Adisson o la anemia perniciosa (Sánchez-Corona y col., 2002).

- **Diabetes idiopática**

Algunas veces la diabetes tipo 1 no presenta una etiología conocida que explique su intensa insulinopenia y su proclividad a la cetoacidosis, pues en estos pacientes no hay evidencia de autoinmunidad. Estas formas de diabetes son más frecuentes en africanos y asiáticos. Se trata de una diabetes con un importante

componente hereditario y sin asociación con el sistema HLA (Unger y Foster, 1998).

DIABETES TIPO 2

Esta forma de diabetes, antes denominada DMNID, diabetes tipo II o diabetes aparecida en la madurez, se aplica a las personas que presentan resistencia insulínica y una deficiencia en la secreción de insulina. Por lo general son pacientes que no precisan insulina para sobrevivir ni al principio ni tampoco a lo largo de la vida. Se acepta que en su génesis operan diferentes causas y se piensa que, en el futuro, una buena identificación de éstas permitirá reducir su frecuencia en la sociedad, siendo indudable que la autoinmunidad no es una de ellas (Islas-Andrade y Lifshitz-Guinzberg , 2002).

En su mayoría se trata de sujetos obesos y la obesidad por sí misma causa algún grado de resistencia a la insulina. Aquellos que no pueden ser calificados como tales, de acuerdo con los patrones habituales, suelen presentar un incremento de la grasa abdominal, denominada también grasa visceral. La cetoacidosis es muy infrecuente en esta forma de diabetes y, cuando ocurre, está siempre asociada con el estrés de una grave complicación, generalmente una infección severa; es un trastorno que puede pasar desapercibido durante muchos años, tanto por su desarrollo lento y gradual como por la ausencia de los síntomas clásicos de la enfermedad (Lisker-Yorkowitsky y Mutchinik -Baringoltz 1997).

Se trata de pacientes que pueden desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares. En ellos es frecuente encontrar, junto a la hiperglucemia, niveles normales e incluso elevados de insulina, que obviamente no consiguen restaurar

un perfil normal de la glucemia, lo cual evidencia que se trata de una insuficiencia insular relativa, que no consigue superar la resistencia a la insulina que es característica de estos enfermos (Islas-Andrade y Lifshitz-Guinzberg , 2002).

Cabe señalar que la resistencia a la insulina, que es el fenómeno originario del trastorno, puede ser aminorada con la reducción del peso y el ejercicio, así como con medicación farmacológica, aunque raramente puede ser restaurada la normalidad. El riesgo de contraer diabetes tipo 2 aumenta con la edad, la obesidad y la ausencia de actividad física, y se mantiene en la actualidad que ocurre con más frecuencia en la mujer con diabetes gestacional previa y en personas con hipertensión arterial o dislipidemia. Las más recientes evidencias confirman que hay una fuerte predisposición genética en su origen, superior al que pueda darse en la diabetes tipo 1 (Unger y Foster 1998).

El páncreas de los pacientes con DM tipo 2 genera y libera insulina pero ésta resulta insuficiente (Gerich, 1996). Este tipo de DM es una de las enfermedades más comunes en las personas adultas. En nuestro país su frecuencia varía entre el 6.7 y 8.7 y en las poblaciones urbanas del norte del país incluso se han llegado a reportar frecuencias del 12%. En los pacientes con DM tipo 2 es donde se encuentra la mayoría de los casos de ceguera, enfermedad renal y otras complicaciones. Además, cabe señalar que cerca del 30-40% de la gente con DM tipo 2 requieren la insulina (Guerrero-Romero y col., 1997).

OTROS TIPOS ESPECIFICOS DE DIABETES

- **Defectos genéticos de la célula β**

Diversas formas de diabetes están asociadas a defectos monogénicos con repercusión sobre la función insular. Se caracterizan por aparecer en gente joven, con edades por debajo de los 25 años y por tratarse de hiperglucemias leves o moderadas, habiendo sido denominadas hasta ahora diabetes tipo MODY, es decir, diabetes de la madurez joven, caracterizada por una secreción alterada de la insulina en ausencia o con mínima afectación de la acción insulínica. Poseen un patrón de herencia autosómica dominante y hasta el momento han sido identificados tres loci genéticos sobre diferentes cromosomas (Committee Report, 2003).

- a) El más frecuente en el cromosoma 12, a nivel de un factor nuclear hepatocitario, que se conoce como (HNF)-1 α .
- b) En el cromosoma 7p, que conduce a un defecto en la molécula de la glucocinasa, una enzima que, al transformar la glucosa en glucosa-6-P, origina un sustrato con capacidad de estimular la secreción de insulina, de manera que se convierte en un "sensor" de la glucosa; al reducirse la actividad de la glucocinasa aparece hiperglucemia.
- c) Sobre el cromosoma 20q, donde tiene lugar una mutación sobre el gen del HNF-4 α , que es también causa de diabetes, no descartándose otros defectos genéticos hasta el momento no detectados.

Por otra parte, se han descrito mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial vinculadas a la asociación de ceguera y diabetes. Es necesario recordar que se han descrito algunas familias con incapacidad para transformar la proinsulina en insulina, con un patrón dominante autosómico; por último, diversas mutantes de la molécula de insulina que modifican su ligamiento al receptor de la insulina, y

obviamente alteran el consumo periférico de la glucosa. En ambos casos el defecto da lugar a un grado discreto de intolerancia a la glucosa (Sánchez-Corona y col., 2002).

- **Defectos genéticos en la acción de la insulina**

Las anomalías metabólicas asociadas con mutaciones en el receptor de la insulina pueden dar lugar a grados muy variables de hiperglucemia. Algunos de estos individuos –a veces son formas familiares- pueden desarrollar acantosis nigricans, las mujeres afectadas pueden desarrollar ovarios agrandados y quísticos, así como grados diversos de hiperandrogenismo. En el pasado, el síndrome fue denominado “resistencia insulínica tipo A”. Al mismo grupo pertenecen el lepreuchanismo y el síndrome de Rabson-Mendenhall, dos síndromes pediátricos de extrema resistencia insulínica. Finalmente, cabe incluir aquí también la denominada diabetes lipoatrófica, en la que no se ha podido demostrar un defecto en la estructura del receptor de insulina, por lo que se asume un defecto en el reconocimiento de las señales a nivel postreceptor (Sánchez-Corona y Col., 2002).

- **Enfermedades del páncreas exocrino**

Algunos procesos que causan daño celular difuso en el páncreas pueden dañar igualmente la secreción de insulina. Es el caso de la pancreatitis, del traumatismo, de la pancreatectomía y del carcinoma pancreático. Por mecanismos similares pueden actuar la fibrosis quística del páncreas y la hemocromatosis, que dañan las células β y alteran la secreción de insulina (Unger y Foster, 1998).

- **Endocrinopatías**

Diversas hormonas (hormona del crecimiento, glucagón, epinefrina, cortisol, etc.) antagonizan la acción de la insulina; por ello, su secreción excesiva puede producir diabetes o intolerancia a la glucosa. Por lo tanto, en la acromegalia, en el glucagoma, en el feocromocitoma y en el síndrome de Cushing puede aflorar diabetes. Por lo general se trata de personas con defectos preexistentes en la secreción de insulina y la hiperglucemia desaparece cuando la causa del exceso de hormona es eliminada.

- **Diabetes inducida sustancias químicas**

Muchos mecanismos actúan desencadenando una diabetes en personas con resistencia a la insulina. Aunque en muchos casos es difícil establecer el mecanismo específico (si es un incremento de la resistencia a la insulina, una pequeña disfunción insular, o ambos). Así, la toxina Vacor por vía intravenosa puede destruir las células β pancreáticas, o los glucocorticoides y el ácido nicotínico, a los que se reconoce que pueden deteriorar la acción de la insulina (Islas Andrade y Lifshitz-Guinzberg, 2002).

- **Infecciones**

Existe evidencia de que ciertos virus tienen la capacidad de destruir los islotes pancreáticos y provocar diabetes. Tal es el caso de los sujetos portadores del virus de la rubéola congénita, aunque en su mayor parte también son portadores de

marcadores de daño autoinmune. Otros virus señalados son *Coxsackie*, adenovirus, los citomegalovirus, etc. (Sánchez-Corona y col., 2002).

- **Formas raras de diabetes mediadas por mecanismos autoinmunes**

El Comité de expertos incluye en esta categoría tres variantes. En primer lugar, el síndrome del hombre tieso o rígido (*stiff-man syndrome*), que es un trastorno autoinmune del sistema nervioso, caracterizado por gran rigidez de la musculatura axial y por espasmos dolorosos, muchos de cuyos pacientes presentan títulos altos de autoanticuerpos contra GAD y desarrollan diabetes. Anticuerpos de esta naturaleza han sido descritos en pacientes con lupus eritematoso y otras enfermedades autoinmunes. Completan la triada los casos de extrema resistencia a la insulina que desarrollan *acantosis nigricans* y a los que anteriormente se había denominado "resistencia a la insulina tipo B" (Unger y Foster, 1998).

- **Otros síndromes genéticos asociados a diabetes**

Se hace alusión a los síndromes de Down, Klinefelter, Turner y Wolfram, este último es un desorden autosómico recesivo caracterizado por diabetes deficiente en insulina y ausencia de células β en los islotes, que también puede asociarse a diabetes insípida, hipogonadismo, atrofia óptica y sordera.

- **Diabetes mellitus gestacional**

La diabetes gestacional es definida como algún grado de intolerancia a la glucosa que aparece o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Seis o más

semanas después del parto la mujer deberá ser reclasificada e incluida en algunas de las categorías aceptadas, esto es: a) diabetes, b) glucosa en ayuno alterada c) tolerancia alterada a la glucosa y d) paciente sin alteración de la tolerancia a la glucosa, que es a lo que se abocan la mayoría de las gestantes tras el parto (Sánchez-Corona y col., 2002).

2.1.4. ETIOPATOGENIA

a) Diabetes mellitus tipo 1

- **Diabetes mellitus tipo 1 Idiopática**

Se incluye bajo este nombre aquellas formas de diabetes mellitus tipo 1 (DM1) de etiología desconocida, en las que no existe evidencia de autoinmunidad. Aunque sólo incluye a una minoría de pacientes con diabetes tipo 1, la mayoría son de origen africano o asiático. Tiene un carácter fuertemente hereditario, no existen datos de autoinmunidad contra la célula β y no se ha encontrado asociación con el sistema HLA (Unger y Foster 1998).

- **Diabetes mellitus tipo 1 Autoinmune**

En el desarrollo de la DM1 autoinmune están implicados tanto factores genéticos como ambientales. El concepto tradicional es que factores ambientales tales como agentes microbianos y químicos pudieran actuar como disparadores de la respuesta inmune contra la célula β en un fenotipo genéticamente predispuesto al desarrollo de diabetes. Es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica debida a la destrucción de las células β productoras de insulina por parte de células mononucleares autorreactivas que específicamente infiltran los islotes (insulitis)

antes y poco tiempo después del desarrollo de la misma. Esta enfermedad, en la que sólo la célula β es destruida por la respuesta inmune, constituye el paradigma de la autoinmunidad organoespecífica (Gómez-Díaz y col., 1997).

1. **Factores Genéticos.**- La susceptibilidad de desarrollar DM1 es hereditaria y existen diferencias marcadas en el riesgo de padecerla en función de la relación familiar con el paciente diabético. En este sentido, conviene recordar que el riesgo máximo se produce en los gemelos monocigóticos de los pacientes afectos, pudiendo aparecer hasta en el 70% si se realiza un control evolutivo a largo plazo. Si el paciente es el padre, el riesgo de que el hijo la desarrolle es del 6%. Sin embargo, si es la madre es del 2%. No se sabe el motivo por el que los hijos de una madre con DM1 tienen un riesgo inferior que cuando es el padre el que la padece. El principal gen asociado con la predisposición para desarrollar DM1 es el complejo principal de histocompatibilidad (Sánchez-Corona y col., 2002).
2. **Factores ambientales.**- El concepto tradicional es que tanto agentes microbianos como químicos actuarían como disparadores de la respuesta inmune contra las células β del páncreas en un individuo con predisposición genética. Recientemente se ha dado importancia creciente al papel de los factores ambientales en la génesis de la DM1 (Arreola Ortiz y Partida-Hernández 2002).
3. **Virus.**- La infección por determinados virus actuaría como disparadora de una serie de cambios inmunológicos complejos que están asociados con la destrucción de la célula β . Esta podría ocurrir a través de tres mecanismos: a)

destrucción celular directa por virus, b) por generación de citocinas que dañan las células β o c) mimetismo molecular (Arreola Ortiz y Partida-Hernández 2002).

La hipótesis vírica podría explicar por qué el comienzo de la enfermedad es más frecuente en otoño y en invierno y en los climas más fríos. Los virus que han sido relacionados de una forma u otra con el desarrollo de diabetes en el ratón y/o en el hombre son el virus de la parotiditis, rubéola y otros, entre los que se encuentran los Coxsackie del grupo A o B, el citomegalovirus, los reovirus o el virus de la encefalomiocarditis. La infección por Coxsackie B4, una de las más estudiadas, provoca una expresión dos a tres veces superior del antígeno glutámico decarboxilasa en los islotes de los ratones susceptibles de desarrollar diabetes, y la mayoría de los animales infectados desarrollan más tarde anticuerpos anti GAD e hiperglucemia (Vargas-Alarcón y Granados-Arriola, 1997).

4. Otros factores ambientales.- Existen agentes químicos capaces de provocar una destrucción no autoinmune de las células β como la estreptozotocina y la aloxana en animales y el veneno Vacor en humanos. La inhalación materna de compuestos N-nitrosos se ha relacionado con el desarrollo de diabetes autoinmune en niños en Islandia.

5. Aspectos Inmunológicos.- La autoinmunidad se define como la ruptura del mecanismo de tolerancia contra lo propio de tal forma que las células inmunocompetentes de un organismo comienzan a atacar a tejidos y células del mismo. Los mecanismos por los que los componentes del sistema inmune

dan lugar al desarrollo de una diabetes franca implican el papel de los linfocitos T, los autoantígenos y los autoanticuerpos.

b) Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es un síndrome metabólico causado por una combinación variable de deficiencia de insulina y de insensibilidad a los efectos hipoglucemiantes de la misma (insulinorresistencia). Esta última, sólo produce diabetes cuando la reserva secretora de los islotes está también deteriorada y no puede producirse la hiperinsulinemia compensatoria. El desarrollo de la insulinorresistencia precede a la aparición de diabetes franca y puede aumentar en relación con la mayor hiperglucemia, de tal forma que un tratamiento intensivo para disminuir la glucosa puede mejorar la sensibilidad a la insulina. Por tanto, la hiperglucemia desempeña un papel en la génesis de la resistencia insulínica, y la hiperinsulinemia puede afectar la función de la célula β . Esta compleja relación provoca en la mayoría de los diabéticos insulinorresistencia y menor secreción de insulina. Dilucidar cual de los procesos ocurre en primer lugar y tiene más importancia en el desarrollo de la diabetes es complicado. Además, ambos fenómenos coexisten en la mayoría de los casos. Con buen criterio la Asociación Americana de Diabetes (ADA) propone que en la DM tipo 2 coexisten ambos defectos, predominando uno u otro según los casos (Committee Report, 1997).

- **Factores genéticos**

El estudio genético de la DM tipo 2 existen mayores dificultades y los progresos realizados hasta ahora han sido escasos. Esto se debe a que se trata de una

enfermedad poligénica, con combinaciones de genes que dan lugar a diabetes vía distintos patrones como son los defectos en la insulinosécración, la insulinoresistencia y la obesidad (Lisker-Yorkowitsky y Mutchinik Baringoltz, 1997).

Entre los genes candidatos para el síndrome metabólico destacan (Sánchez-Corona y col., 2002). :

- **Gen IRS-1.**- Un polimorfismo en los aminoácidos de este gen puede interferir n el patrón d señalización de la insulina, lo que se asocia con insulinoresistencia en individuos no diabéticos y parece más frecuente en la DM tipo 2.
- **Gen de la glucogenosintetasa.**- En la DM tipo 2 existe de forma característica una alteración en el estímulo de la síntesis del glucógeno. Se han encontrado polimorfismos de este gen en la DM tipo 2 en Finlandia y en los indios Pima, pero por el momento no se han detectado mutaciones comunes.
- **Genes que regulas la lipólisis.**- La lipólisis es una pieza clave en la determinación del gasto energético. Los defectos en los genes que la regulan, podrían predisponer a la obesidad abdominal y al menor gasto energético.
 - **Factores ambientales** (Unger y Foster, 1998):
- **Genotipo y fenotipo ahorradores.**- Se ha utilizado la hipótesis del genotipo ahorrador para explicar la alta tasa de DM tipo 2 entre las poblaciones que han experimentado un cambio reciente en el estilo de vida desde una forma rural a una forma occidentalizada. Esta hipótesis propone que entre individuos con una disponibilidad variable de comida, resulta interesante almacenar una proporción alta del gasto energético en forma de grasa, que pueda suplir los

periodos de escasez. Cuando esto individuos pasan a una situación de aporte continuo de comida aparecen obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes.

La hipótesis del fenotipo ahorrador postula que la malnutrición fetal disminuye el crecimiento fetal, provoca un peso bajo al nacer y de forma específica una alteración en el desarrollo de las células de los islotes. Posteriormente, en la vida adulta si el deterioro de la célula B se asocia con edad avanzada y obesidad se desarrollará una tolerancia a la glucosa anormal (Lisker-Yorkowitsky y Mutchinik Baringoltz, 1997)..

- **Edad.**- La prevalencia de la DM tipo 2 aumenta con la edad y es mucho más frecuente arriba de los 60 años.
- **Obesidad.**- El riesgo de desarrollar DM tipo 2 aumenta de forma paralela con la obesidad. Este riesgo se correlaciona más con la obesidad central que con la periférica, ya que los adipocitos centrales tienen una capacidad mayor de liberar ácidos grasos libres que provocan insulinoresistencia en el hígado y el músculo. Además estos adipocitos tienen un acceso más directo al hígado que los periféricos.
- **Dieta.**- La dieta es un factor fundamental en la aparición de la obesidad y en consecuencia pudiera desempeñar un papel importante en el desarrollo de la DM tipo 2. De hecho una dieta rica en grasas saturadas es probablemente el principal determinante dietético de la enfermedad. Recientemente, en un estudio longitudinal se ha relacionado la ingesta de alimentos con índice glucémico alto, capaces de causar un aumento de glucosa importante y una demanda de insulina elevada con el riesgo de desarrollar la enfermedad.

- **Ejercicio y actividad física.**- La actividad física regular reduce el riesgo de desarrollar DM tipo 2, aunque el efecto sea menos marcado en mujeres que en hombres. La contracción del músculo esquelético provoca una captación de la glucosa circulante mayor que en reposo, que continúa cuando el ejercicio ha terminado para restablecer los depósitos de glucosa. Este efecto está mediado en parte por la adrenalina y es responsable de la mejoría en la sensibilidad a la insulina que produce el ejercicio. Además la actividad física tiene efectos favorables en el metabolismo de los lípidos y contribuye en la disminución de peso.
- **Defectos en la función de la célula β :** La progresión de la tolerancia normal a la glucosa a la intolerancia, se caracteriza por un estado de hiperinsulinemia. Posteriormente se produce un lento declinar en los niveles de la insulinemia basal y la estimulada por glucosa hasta que se produce la diabetes. La masa total de células β es un factor determinante en la secreción de la insulina. La mayoría de los estudios demuestran que existe una reducción en dicha masa en los pacientes con DM tipo 2 de larga evolución. Sin embargo, en algunas pancreatectomías se producen reducciones similares sin que aparezca diabetes. Esto hace suponer que el factor histopatológico no justifica por sí solo las alteraciones funcionales de la célula β (Sánchez-Corona y col., 2002).
- **Defectos cuantitativos.**- Se ha podido evidenciar que en la DM tipo 2 establecida existe una secreción de insulina deficiente.
- **Defectos cualitativos.**- Además de una secreción de insulina menor los pacientes con DM tipo 2 presentan cambios en la dinámica de la misma, que

pueden tener efectos críticos en su acción. La primera fase de la secreción de insulina consiste en una elevación que sigue a la administración de un secretagogo, por ejemplo, un bolo intravenoso de glucosa. El pico aparece a los 2-4 minutos y desaparece en los 6-10 siguientes. Esta fase está reducida o se pierde en fases precoces de la DM tipo 2 (Lisker-Yorkowitsky y Mutchinik Baringoltz, 1997).

Entre las posibles causas del daño de la célula β se barajan causas genéticas, la mal nutrición intraútero, la glucotoxicidad, la lipotoxicidad y los depósitos de amilina y otros péptidos.

- **Glucotoxicidad.-** Es un concepto clásico apoyado en múltiples estudios que ponen en evidencia el hecho de que la hiperglucemia pueda ejercer un efecto en la secreción de insulina. Además, existen datos que indican que una exposición prolongada de la célula β a concentraciones elevadas de glucosa puede deteriorar la transcripción del gen de la insulina, lo que provocaría una síntesis y secreción menores. Además la hiperglucemia crónica modifica la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo de la glucosa (Lisker-Yorkowitsky y Mutchinik Baringoltz, 1997).
- **Insulinorresistencia.-** Se define como la incapacidad de la insulina para ejercer sus efectos biológicos habituales a concentraciones que son eficaces en los sujetos normales. La sensibilidad a la insulina varía ampliamente entre los individuos con normoglucemia y los que presentan hiperglucemia, mientras que es menor en los que tienen DM tipo 2.

El sitio principal de la insulinoresistencia en la DM tipo 2 es el músculo esquelético, en donde tiene lugar una captación de glucosa mediada por insulina menor que en las personas no diabéticas. La resistencia se debe a defectos a nivel postreceptor y existe un deterioro de la acción de la insulina a múltiples niveles. El hígado también es insulinoresistente en la DM tipo 2, de tal manera que la insulina no suprime la producción hepática de glucosa de forma tan eficaz como lo hace en los individuos sanos. También está alterada la inhibición de la misma que produce la hiperglucemia. Asimismo, el adipocito también es insulinoresistente, y los niveles de insulina no son capaces de suprimir la lipólisis, con lo que aumentan los niveles de AGL. Estos pueden estimular la gluconeogénesis, la síntesis de triglicéridos y la producción hepática de glucosa en el hígado e inhibir la captación de glucosa por el músculo y reducir la extracción de insulina por el hígado. Todo esto supone un empeoramiento de la resistencia a la insulina y de la hiperglucemia. Por otra parte, la mayor expresión del TNF- α que existe tanto a nivel de los adipocitos como del músculo esquelético puede producir insulinoresistencia al inhibir la actividad tirosinoquinasa del receptor de la insulina (Unger y Foster, 1998).

La insulinoresistencia se asocia a menudo con obesidad, intolerancia a la glucosa, hipertensión, dislipidemia, sobre todo hipertrigliceridemia y cifras bajas del colesterol HDL, alteraciones en la coagulación de la sangre, aterogénesis acelerada. Esta asociación ha recibido el nombre de síndrome X. A su desarrollo puede que contribuyan los niveles elevados de insulina que se producen de forma secundaria a la insulinoresistencia en los tejidos metabólicos (Unger y Foster, 1998).

2.1.5. SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA DIABETES

En la actualidad, los síntomas y signos de la DM se suelen referir como polidipsia, polifagia, poliuria, cansancio y debilidad física, pérdida de peso corporal sin causa aparente, glucosuria y aumento de algunos productos intermedios del metabolismo de las grasas (cuerpos cetónicos), tanto en sangre como en orina (cetonemia y cetonuria). Además, la DM está asociada con la aparición de complicaciones agudas y crónicas (Molitch, 1989), tales como:

- 1) Cetoacidosis, ante la incapacidad de utilizar glucosa, se metabolizan los lípidos y productos de su degradación (acetona, ácidos beta hidroxibutírico y acetoacético).
- 2) Coma hiperosmolar, debido al aumento en la osmolaridad del filtrado glomerular causado por la hiperglucemia, se produce la deshidratación por diuresis osmótica.
- 3) Macroangiopatía, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia aceleran el desarrollo de la aterosclerosis que en las arterias coronarias es causa de infarto del miocardio y en otros vasos de trombosis y embolias, también es causa de gangrena en los miembros inferiores.
- 4) Nefropatía, es debida al engrosamiento de la membrana basal celular causando albuminuria y posteriormente insuficiencia renal. Esta complicación puede causar la muerte del paciente diabético.
- 5) Complicaciones oculares, entre el 80 y 100 % de los diabéticos presentan retinopatía causada por lesiones fundamentales (aumento en la permeabilidad capilar, microaneurismas, hemorragias) y proliferativas (neovascularización, cicatrización o desprendimiento de retina).

6) Neuropatía, frecuente en el enfermo diabético, afecta prácticamente cualquier parte del sistema nervioso, excepto el cerebro.

Dichas complicaciones son las principales causas de invalidez y mortalidad de los pacientes con DM (Crabbe, 1987; Molitch, 1989; Ayala, 1990; Blanco de la Mora, 1995).

2.1.6. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES

Los criterios para el diagnóstico de la DM están relacionados con diversas técnicas de laboratorio para determinar:

1. La concentración de glucosa en sangre
2. La concentración de glucosa en orina
3. Los niveles de hemoglobina u otras proteínas ligadas a azúcares reductores o proteínas glicadas (Roth, 1983; Kennedy, 1992).

De acuerdo con las recomendaciones del Comité de Expertos de la American Diabetes Association (1997), organismo encargado de evaluar los avances en el conocimiento acerca de la DM, los criterios para obtener un diagnóstico de DM con base en la determinación de la concentración de glucosa en sangre, deben abocarse a los tres procedimientos generales siguientes:

- 1) Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia y pérdida de peso) más concentración de glucosa plasmática al azar (a cualquier hora del día) > 200 mg/dL (11.1 mmol/l).
- 2) Glucosa plasmática en ayunas (al menos de 8 horas) > 126 mg/dL (7.0 mmol/l).
- 3) Realizar mediciones mediante pruebas de tolerancia a la glucosa orales (PTGO).

Un nivel de glucosa plasmática en ayunas igual o superior a 126 mg/dL en dos ocasiones indica que la persona es diabética; si las mediciones se hacen al azar, el valor de la glucemia no debe sobrepasar los 200 mg/dL en más de una ocasión. La limitación de estos dos primeros procedimientos es que, en algunos casos, no pueden detectar disfunción metabólica (debido a que estas pruebas son poco sensibles), lo que hace necesario, realizar PTGO, sobre todo en aquellos pacientes con glucemias en ayunas entre 100 y 125 mg/dL (Nelson, 1988; Singer y col., 1989; Trujillo y col., 1996; Comité Report, 1997, 2003).

Para realizar una PTGO se requiere de la ingesta de glucosa siendo de 75 g en adultos y de 1.75 g/kg en niños. La prueba se realiza después de un ayuno de 10 a 16 horas y se toman muestras sanguíneas en ayunas, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la carga de glucosa. Los sujetos deben ingerir durante los tres días previos al estudio mínimo 150 g diarios de carbohidratos. Un diagnóstico positivo de DM, mediante esta prueba, se obtiene cuando al menos dos valores de glucosa plasmática son mayores o iguales a 200 mg/dL, incluyendo el valor a las 2 horas (ADA, 1997; Trujillo y col., 2004a, 2004b).

En un paciente diabético la PTGO no debe realizarse, ya que contribuiría a agravar el estado diabético al paciente (Nelson, 1988).

La medición de glucosa urinaria, por su parte, es generalmente una prueba diagnóstica inadecuada. Aunque es útil para detectar pacientes cuya hiperglucemia está produciendo exceso de orina, aún en este caso es necesario confirmar el diagnóstico con una prueba de glucosa sanguínea (Singer y col., 1989).

La medición de hemoglobina glicada principalmente HbA1 (antes conocida como hemoglobina glucosilada) puede servir en el diagnóstico de la DM (Roth, 1983). Sin embargo, la prueba en general es incapaz de detectar casos de diabetes leve o con disminución de tolerancia a la glucosa. En algunos casos, la prueba puede dar resultados positivos para la diabetes, cuando en realidad se trata de sujetos sanos, por lo que para obviar estas dificultades, el médico debe confirmar todas las pruebas de hemoglobina glicada elevada con una PTGO (Medow, 1997).

En general, se puede decir que los criterios diagnósticos basados en la hemoglobina glicada correlacionan bien con los correspondientes basados en la glucemia. Una glucemia inferior a 160 mg/dL corresponde con valores de HbA1 menores a 9%, glucemias entre 169 y 230 mg/dL correlacionan con valores de HbA1 de 9 a 11%. Valores más altos de glucosa plasmática con intervalos de 230 a 310 mg/dL equivalen a HbA1 de 11 a 14% (Singer y col. 1989; Tchobroutsky, 1991).

Se acepta de manera general que los cambios metabólicos y tisulares característicos de la diabetes mellitus pueden evitarse mediante un adecuado control de la glucemia. Dado que la glucemia en los diabéticos se encuentra alta como consecuencia de la falta de actividad insulínica, en algunos casos la tendencia en el tratamiento ha sido administrar insulina exógena y en otros incrementar de alguna manera la secreción y/o la actividad de la insulina endógena.

2.1.7. TRATAMIENTO DE LA DIABETES

El tratamiento de la diabetes mellitus se realiza fundamentalmente con base en cuatro factores que son: la educación del paciente en cuanto a su padecimiento, el ejercicio físico, la dieta adecuada y los medicamentos hipoglucemiantes (Chenault, 1979; ADA, 1990, Vinik y Richardson, 1997; Baliga y Fonseca, 1997).

La educación del paciente en cuanto a su enfermedad, debe iniciar con una comprensión de los aspectos de la DM, esto es, para que el paciente participe activamente en el manejo de su enfermedad, debe conocerla por lo menos en sus principales aspectos etiológicos, de diagnóstico, control y complicaciones. La instrucción del paciente diabético debe abarcar también conocimientos de: hábitos higiénicos, cuidados de la piel y de los pies; cuidado dental y de la vista; y de salud en general. Así como, vigilancia de la glucemia y glucocetonuria, técnicas de inyección, características de los comas hipoglucémico y cetoacidótico, cómo prevenirlos, identificarlos y tratarlos. El control de la DM será efectivo siempre y cuando el paciente participe en él activamente, ya que la responsabilidad cotidiana del control de la DM recae en el propio enfermo, quedando al médico una supervisión y asesoría. Sin la colaboración del enfermo, la dieta, el ejercicio físico y la farmacoterapia quedan invalidados en cuanto a su objetivo principal (Rubin y col., 1989; Brennan, 1996).

El ejercicio físico es necesario en los pacientes diabéticos porque aumenta considerablemente la utilización de la glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos circulantes en la sangre, fortalece los músculos, mantiene en todos los tejidos y órganos la circulación sanguínea óptima, evita el almacenamiento de grasa, mantiene la elasticidad y aumenta la resistencia general del organismo, disminuye

la angustia y la ansiedad y mejora el sueño y bienestar (Gulias-Herrero y Gómez-Pérez, 1997; Larsen y col., 1997).

La dieta juega un papel fundamental en el control de la DM, es aún la base del tratamiento en diabéticos obesos y un factor indispensable en la terapia insulínica o con hipoglucemiantes orales (Derot y Tchobroutsky, 1970). La dieta es importante en el control del peso corporal, ya que la obesidad está relacionada con la disminución en el número de receptores para la insulina y por consiguiente con el desarrollo de resistencia a esta hormona. Además de lo anterior, existen reportes que indican que la dieta rica en fibra reduce la glucosa sanguínea (White, 1996; Baliga y Fonseca, 1997).

La dieta tiene un papel muy importante en el tratamiento de la diabetes mellitus, sin embargo, en la mayoría de los casos es incapaz por sí sola de normalizar los disturbios en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas característicos de este padecimiento, por lo que se hace necesario recurrir a los medicamentos.

Se debe recurrir a los medicamentos hipoglucemiantes en todos aquellos casos de DM en los que la dieta y el ejercicio físico resulten insuficientes para normalizar la glucemia. Dentro de los medicamentos hipoglucemiantes se encuentran la insulina y los hipoglucemiantes orales: sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de las α -glucosidasas y tiazolidinedionas (Gómez-Pérez y Rull, 1997; García-García, 1997; Flores-Saenz y col., 2003).

El descubrimiento de la insulina fue un paso trascendental en el tratamiento de la DM. Su uso ha permitido prolongar considerablemente la sobrevida de los

pacientes diabéticos. No obstante, estudios recientes indican que la terapia insulínica no siempre puede evitar las complicaciones vasculares de la diabetes mellitus (Stout, 1979). Las investigaciones acerca de esta hormona se han dirigido hacia la obtención de insulinas con mayor grado de pureza y se ha logrado comercializar una insulina porcina (Inouye, 1979) y otra totalmente humana obtenida mediante la técnica del ADN recombinante (Gait, 1979; Chance y Frank, 1993). Por otro lado, la administración parenteral de la insulina algunas veces produce en los pacientes reacciones adversas debido al método en sí mismo y al dolor e incomodidad que representa (Zárate, 1987).

Desde el descubrimiento de la insulina se ha intentado en vano obtener este compuesto en una forma que libere a los pacientes de la necesidad de las inyecciones diarias. Fue hasta el descubrimiento de los hipoglucemiantes orales, con la introducción de las sulfonilureas en 1942 y de las biguanidas en 1957 que este problema pudo superarse parcialmente pues su uso terapéutico se limita a individuos con diabetes mellitus tipo 2 (Loubatieres, 1957; Judzewitsch y col., 1982; Vigneri y col., 1982; Glombik, 1986, Gerich, 1996).

En la actualidad los medicamentos orales para tratar la hiperglucemia de los diabéticos no insulino dependientes son las sulfonilureas de "primera generación" (tolbutamida, tolazamida, acetohexamida y cloropropamida), las de "segunda generación" (glibenclamida y glipicida), de "tercera generación" (glimepirida), las biguanidas (fenformina y metformina), los inhibidores de la α -glucosidasa y las tiazolidinedionas.

El mecanismo de acción de las sulfonilureas consiste en estimular al tejido insular del páncreas para secretar insulina, causando desgranulación de las

células β . No tienen efecto en pacientes totalmente pancreatectomizados y, en diabéticos insulino dependientes, tienen la capacidad de inhibir la liberación de catecolaminas (Faber y col., 1990; Gómez-Pérez y Rull, 1997, Turner y col., 1999).

Las biguanidas disminuyen la hiperglucemia sin causar cambios detectables en la concentración de insulina plasmática, aunque para manifestar su acción requieren la presencia de ésta. Estos fármacos, inhiben el metabolismo oxidativo provocando un aumento en la captación de glucosa para metabolizarla en forma anaerobia hasta ácido láctico, también producen una disminución en la unión de la insulina a las proteínas del plasma (Stumvoll y col., 1995; Cusi y col., 1996; García-García, 1997; Turner y col., 1999).

Los inhibidores de las α -glucosidasas, como la acarbosa, que actúan en la luz del intestino. Disminuyen la glucemia postprandial, el área bajo la curva glucémica, la glucosilación de la hemoglobina, la insulina postprandial y las concentraciones séricas de lípidos (ANM, 1997).

Las tiazolidinedionas, como la rosiglitazona y pioglitazona, actúan incrementando los transportadores de glucosa, especialmente los transportadores GLUT-4 en el músculo esquelético y tejido adiposo, disminuyendo de la resistencia a la insulina, disminuyéndose por consiguiente la hiperglucemia existente en los pacientes con DM tipo 2 (Roman Ramos y col., 2000; Lebovitz y col., 2001; Flores-Saenz y col., 2003; Martens y col., 2004; Charbonnel y col., 2004).

Es indudable el beneficio que han recibido millones de diabéticos en todo el mundo con el desarrollo de metodologías para la producción a gran escala de la

insulina humana y de los hipoglucemiantes orales. Sin embargo, ninguno de éstos ha probado ser el medicamento ideal.

Aunque son innegables el progreso en el control del paciente diabético, aún quedan muchos problemas por resolver como son la administración y dosificación correcta de la insulina e hipoglucemiantes orales.

El problema de la dosificación de la insulina se ha tratado de resolver con:

a) Transplante de páncreas. Aunque en sus inicios se encontró con muchos problemas técnicos que actualmente ya han sido superados en su mayor parte, aún continúa sin resolverse el problema de histocompatibilidad, el cual lleva invariablemente al rechazo del órgano trasplantado (Jonasson, 1979; Sutherland, 1981; Román-Ramos y col., 1979, 1981; Román-Ramos, 1984).

b) Injerto de islotes pancreáticos. Las complicaciones del trasplante de páncreas debido a la presencia de tejido exocrino, llevaron a iniciar las investigaciones para la obtención, cultivo y trasplante de islotes pancreático. No obstante, el problema principal sigue siendo el rechazo del injerto (Sutherland, 1981; Reemtsa y col., 1979; Meza-Mendoza y col., 1997; Barrera-Escorcía y col., 2005).

c) Implantación de bombas de insulina. Éstas tratan de imitar a la célula β del páncreas en cuanto a la liberación de insulina. Están integradas por un sensor que determina el nivel de glucosa en la sangre, un microprocesador de datos que determina la cantidad de insulina que necesita el organismo tomando en cuenta la glucemia y una bomba con depósito de insulina, para liberar a ésta de acuerdo a la orden recibida del microprocesador. El principal problema que no se ha resuelto, es que no se ha encontrado un material inerte que al estar en contacto de manera

permanente con la sangre no sea cubierto con fibrina (Roman-Ramos y col., 1979; Watkins, 1980; Saudek y col., 1996).

Las alternativas antes mencionadas son muy costosas y no se encuentran al alcance de la población masiva de los países en vías de desarrollo. Por lo anterior, más del 70% de la población mundial tiene que recurrir a la medicina tradicional como única alternativa a su alcance, para resolver sus principales necesidades de salud (Farnsworth y col., 1989).

2.2 MEDICINA TRADICIONAL (HERBOLARIA)

El conocimiento y uso de las plantas medicinales sigue siendo parte importante de la medicina tradicional dentro de las comunidades rurales y sobre todo de las indígenas, quienes durante siglos han preservado sus conocimientos empíricos sobre las propiedades de las plantas, transmitiéndolas y ensayándolas a lo largo de generaciones (Lozoya, 1985, 1987).

El uso de las plantas en la cura y control de diferentes enfermedades tiene orígenes muy remotos. Los primeros indicios de su empleo medicinal se remontan a los pueblos asiáticos y posteriormente, a los egipcios, hebreos y fenicios, entre 8000 y 2000 años a. de C. Más tarde, su uso se difundió entre los griegos y posteriormente en el mundo occidental antiguo. A principios de nuestra era surgen las primeras descripciones de plantas medicinales por Teofrasto, Galeno y Celso, así como en las culturas prehispánicas de Mesoamérica. Se tienen vestigios antropológicos acerca de las prácticas de quienes pudieron ser los hechiceros o magos que preparaban pócimas para curar, dañar o simplemente mezclar hierbas

y plantas durante el ritual mágico practicado en el proceso curativo de los enfermos (Alarcón y col., 1993).

A la llegada de los españoles, éstos encontraron un amplio conocimiento que tenían nuestros ancestros sobre la flora medicinal. Prueba de ello, es el primer libro escrito sobre plantas medicinales mexicanas llamado "Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis" por Martín de la Cruz, traducido al latín por Juan Badiano y publicado en el año 1552.

El conocimiento sobre plantas medicinales ha sido transmitido a través de los siglos en forma oral, causando que la información se pierda o altere. La etnobotánica, que es el estudio de las relaciones que existen entre el hombre y su ambiente vegetal, trata de rescatar la información que de esta forma verbal llega hasta nuestros días y que conforma lo que actualmente se conoce acerca del uso de las plantas. También se define a la etnobotánica como el estudio del conocimiento, significación cultural, manejo y usos tradicionales de la flora por un grupo étnico (Lozoya, 1985).

Es importante hacer énfasis en que las formas de interacción hombre-naturaleza son el resultado de los conocimientos ecológicos y del manejo y utilización de los recursos naturales (flora, fauna y suelo) que han desarrollado los grupos humanos. Así, Caballero hace hincapié en que una amplia gama de formas de manipulación de los elementos del entorno vegetal han proporcionado un amplio conjunto de recursos útiles para la subsistencia y desarrollo de las civilizaciones (Caballero, 1987).

La OMS logró convencer a los países pobres sobre la riqueza y potencialidad de su medicina tradicional, la cual ha sobrevivido durante muchos

siglos incluso en lugares donde los habitantes tienen fácil acceso a los servicios de medicina moderna. Dicha Organización define a la medicina tradicional como "la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos utilizados para el diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos o sociales basados exclusivamente en la experiencia y observación transmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra".

La medicina tradicional se define como un conjunto de conocimientos y prácticas generados en el seno de una comunidad, transmitidos generacionalmente y que, basados en un saber fundamentalmente empírico, ofrecen e intentan dar soluciones a las diversas manifestaciones de la enfermedad, buscando propiciar la salud de la comunidad en la que fueron generados y debido a que este acervo de conocimientos forma parte de la cultura popular, está sujeto a cambios que propician su desarrollo, de tal manera que algunos conocimientos pueden perderse pero pueden encontrarse otros al correr del tiempo (Lozoya, 1987).

A partir de los años 70's, en México se renovó el interés académico por investigar la flora medicinal y la medicina indígena debido a que, en nuestro país, la cubierta vegetal es una de las más variadas de la tierra (Lozoya 1985). En el territorio mexicano están representados todos los grandes biosistemas que se han descrito en la superficie de nuestro planeta, por lo que cuenta con una enorme riqueza de plantas medicinales (Rzedowski y Rzedowski 1987). A pesar de lo anterior, la vegetación ha ido disminuyendo tanto en diversidad como en abundancia, conforme va siendo destruida con fines económicos o por el exceso de depredación. La disminución de la riqueza florística, está contribuyendo

parcialmente al empobrecimiento de los conocimientos tradicionales, aunados a los procesos de transculturación, que son de mayor trascendencia en este hecho, de ahí la necesidad de rescatarlos, mediante la realización de investigaciones abarcando las diferentes líneas que se pueden seguir en el campo de la Etnobotánica.

En la actualidad, se observa una tendencia hacia el uso directo de las plantas en forma de infusiones o extractos de las mismas como medios curativos. El uso de plantas para evitar la pérdida de peso, fatiga, diuresis, trastornos digestivos, apetito exagerado y sed excesiva, síntomas propios de la diabetes, y que se presentan en otro tipo de enfermedades, explican que numerosas plantas se usen por extensión para curar la diabetes. Curiosamente la etiología de la diabetes era desconocida hasta fines del siglo XIX (Martínez, 1980).

La medicina moderna ha visto casi siempre con desprecio e indiferencia a los practicantes de la medicina tradicional y a la mayor parte de sus procedimientos terapéuticos. Sin embargo, es importante anotar que las prácticas curativas de la medicina tradicional se basan en tres recursos principales: plantas, animales y minerales, que por sus cautelosas administración y dosificación, conservadas de manera empírica, generalmente resultan inocuas, no iatrogénicas, a diferencia de lo que frecuentemente se tiene con el uso de medicamentos de patente (Capasso y col., 1980).

Dentro de la llamada medicina tradicional se encuentran las denominadas plantas medicinales, es decir, aquellas con actividad farmacológica, que puestas en contacto con un organismo humano o animal producen sobre éste una terapia (Capasso, 1985).

Es importante recordar que la medicina moderna se ha valido de una gran cantidad de recursos y fármacos procedentes de la medicina tradicional para desarrollar el arsenal farmacéutico contemporáneo. Puesto que un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal fueron el resultado del estudio científico de plantas cuyas propiedades medicinales eran bien conocidas en la herbolaria, podemos inferir que dichos estudios son un método apropiado para el descubrimiento de nuevos medicamentos (Farnsworth y col., 1989).

Debido al gran número de estudios etnobotánicos existentes resulta difícil precisar la cantidad de especies medicinales usadas mundialmente en el tratamiento de la DM. Sin embargo, el análisis de la literatura existente al respecto, nos permite estimar que el número de plantas usadas tradicionalmente como antidiabéticas es superior a 1200. Con el reciente interés mostrado por la OMS en la práctica de la medicina tradicional, se logró motivar la realización de gran número de estudios enfocados a la validación de la acción hipoglucemiante de las plantas antidiabéticas y esto ha permitido que a la fecha, por lo menos en forma parcial, se haya evaluado casi la mitad de las plantas registradas etnobotánicamente (Lamela y col., 1986; Ali-Ajabnor y Karim, 1988; Ivorra y col., 1989; Atta-ur-Raman y Zaman, 1989). De acuerdo con Bayley y Day (1989), las plantas antidiabéticas se pueden agrupar en dos grandes categorías:

1. Plantas que no han sido estudiadas científicamente y que representan aproximadamente un 60 %.
2. Plantas cuyas propiedades antidiabéticas han sido estudiadas científicamente.

Las plantas que si se han estudiado (más de 300 especies) se clasifican de acuerdo al tipo de estudio realizado :

- a) Plantas a partir de las cuales se ha logrado caracterizar parcial o totalmente un agente hipoglucemiante potencial. Los compuestos químicos identificados son polisacáridos, proteínas, esteroides y productos relacionados (Akhtar y Ali, 1985).
- b) Plantas cuyo efecto hipoglucémico se ha podido demostrar en diferentes modelos animales y/o en el hombre pero cuyos principios activos no han sido purificados. De las más de 200 plantas cuyo uso popular ha sido validado científicamente, sólo en el 10 % se han efectuado estudios clínicos. (Karunanayake y col., 1990; Kamani y col., 1994).
- c) Plantas que al evaluarse en diferentes animales de laboratorio no mostraron efecto hipoglucémico importante (Husni y col., 1983; Warren, 1983).

En la mayoría de los trabajos realizados con plantas antidiabéticas se hace notoria la necesidad de estudios etnobotánicos para interpretar los conocimientos populares acerca de la diabetes mellitus, así como el estado clínico por el cual una planta determinada se prescribe, ya que algunas de ellas se utilizan para combatir los síntomas principales de la diabetes mellitus, mientras que otras se usan más bien para aliviar las complicaciones crónicas del padecimiento, aunque también son consideradas por la población como plantas antidiabéticas (Alarcón, 1997; Hernández-Galicia y col., 2002).

En México, *Psacalium peltatum* se encuentra entre las plantas más usadas empíricamente por la población para el control de la DM, y en investigaciones experimentales ha sido ya convalidado el efecto hipoglucémico de su preparación

tradicional, encontrándose dicho efecto entre los de mayor magnitud para plantas con acción hipoglucemiante (Roman-Ramos y col., 1991 y 1992b).

Psacalium peltatum:

Los indios yaqui llamaron "Matarique" (maturi significa mata dolor) a una planta cuya raíz usaban para el control del dolor. En 1887, Guereña la recomendó para todo tipo de dolor, contra la tifoidea, purgante, antirreumática, antigotosa, etc. Actualmente "matarique" es el nombre vulgar de un complejo de cinco plantas: *Psacalium decomposita* (Gray Robins & Brett), *Psacalium peltatum* (H.B.K.), *Psacalium sinuatum* (Cerv), *Acourtia thurberi* (Gray) y *Psacalium sp.*, con características semejantes que se usan en el control empírico de la DM. En los mercados de plantas medicinales de México se pueden conseguir la raíz y rizomas de *Psacalium peltatum* (H.B.K.), como un sustitutos del matarique de Chihuahua: *Psacalium decomposita* (Gray) Robins & Brett, la cual es más difícil de conseguir y más costosa (Bye y col., 1983).

Psacalium peltatum H.B.K. tiene como sinónimos: *Cacalia peltata* H.B.K. y *Senecio peltiferus* Hemsl. Es una hierba perenne que crece en la Sierra Madre Oriental y en el centro de México (Bye y col., 1983). Mide de 0.3 a 1.3 m de alto, su raíz es gruesa y fibrosa, los tallos tienen hojas y brácteas involucrales esparcidas, densamente pilosas o hirsutas, con pelos multicelulares. El tallo principal estriado-acanalado y meduloso, lanoso en la base cerca de la raíz, hojas basales 3 ó 4 en roseta, con pecíolos de 6 a 42 cm de largo, láminas suborbiculares, peltadas y palmatinerves de 10 a 30 cm de diámetro con 6 a 8 nervaduras principales, profundamente multilobadas con 7 a 8 lóbulos primarios,

divididos en 3 a 7 lóbulos secundarios y éstos a su vez con 3 ó 4 lóbulos o dientes más pequeños, coriáceas; hojas caulinares intermedias similares a las basales, pero frecuentemente más reducidas, subpeltadas y semiamplexicaules: inflorescencia paniculadocorimbosa, las ramillas y los pedicelos a veces densamente glandular-estipitadas (Fig. 1). Las ramas originándose en las axilas de brácteas foliáceas, sésiles, ovaladas o en ocasiones angostamente ovaladas, raramente lineales: cabezuelas discoidales de 10 a 100 y de 1 a 1.5 cm de alto, sobre pedúnculos de 0.3 a 2 cm de largo: involucreo campanulado o ligeramente cilíndrico, sus brácteas de 8 a 14, oblongoelípticas, de 8 a 12 mm de largo, acuminadas en el ápice, café rojizas, cálculo con 2 a 5 brácteas angostamente ovadas a lineares, frecuentemente más largas y anchas que las brácteas involucrales: receptáculo plano y ligeramente alveolado. Flores de 10 a 24, de color crema a café o algo purpúreas, con olor desagradable de 14 a 21 mm de largo; frutos aquenios maduros elipsoides a claviformes, de 3 a 6 mm de largo, multiestriados, glabros a tomentulosos, de color crema o verdosos.

Existen tres variedades de *Psacalium peltatum*, de las cuales solamente la típica se encuentra en el Valle de México (Bye y col., 1983).

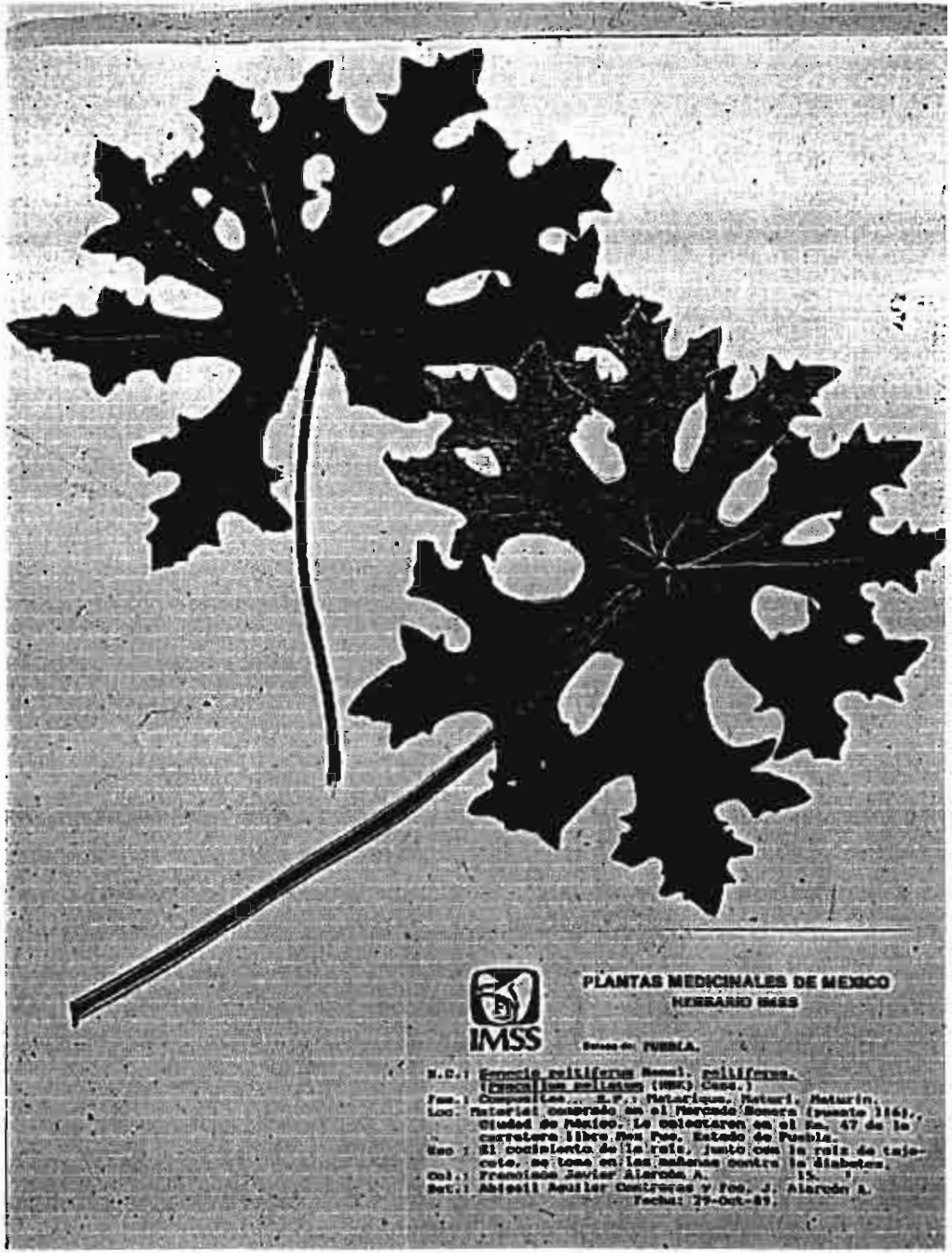


Figura 1. *Psacalium peltatum*. Ejemplar del Herbario IMSS (Alarcón Aguilar, 1990).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La ausencia de un control idóneo para la DM ha llevado a un aumento considerable de la morbimortalidad, la cual no reconoce fronteras, posición económica, raza o religión y representa uno de los más grandes problemas de salud pública a nivel mundial.

La DM como causa de muerte en México se encontraba en noveno lugar en 1980. En 1994 alcanzó el cuarto lugar, cobrando la vida de más de 30 mil personas (Alberti, 1997) y, actualmente, se encuentra en tercer lugar y mueren debido a ella cerca de 50,000 personas. La DM es la enfermedad crónicodegenerativa que más daña a la economía nacional, debido a que incapacita laboralmente a la población.

Actualmente existen varias perspectivas para lograr un mejor control de la diabetes mellitus, entre las cuales podemos citar a los trasplantes segmentario y total del páncreas, al injerto de células y a la implantación de páncreas artificial. Estos métodos todavía no han podido superar algunos problemas técnicos y por su alto costo no se encuentran al alcance de la mayoría de los pacientes diabéticos, quienes tienen que recurrir a la medicina tradicional como único recurso a su alcance.

La medicina tradicional controla a los pacientes diabéticos con base en preparaciones tradicionales de plantas medicinales. Sin embargo, su uso puede tener varios problemas, como la dosificación del principio activo y la presencia de otras sustancias con actividad biológica, que puedan resultar nocivas para la

salud. Estos problemas podrían evitarse con el uso de sustancias hipoglucemiantes puras, a partir de las cuales podrían desarrollarse, previa investigación farmacológica experimental y clínica, agentes hipoglucemiantes orales. En México, la población utiliza en forma empírica más de 250 plantas como antidiabéticas (Alarcón, 1997). Más de la tercera parte de ellas ya ha sido evaluada experimentalmente, convalidándose el efecto hipoglucémico en varias (Alarcón y col., 1993). A pesar de que estas plantas representan una alternativa viable para la obtención de nuevos medicamentos antidiabéticos, hasta ahora la investigación se ha limitado al estudio del efecto hipoglucémico de las preparaciones tradicionales y, no se han realizado estudios dirigidos hacia el aislamiento y purificación química de la sustancia responsable de la actividad hipoglucemiante. (Román-Ramos y col., 1991, 1992a).

Tomando en cuenta lo anterior, es necesario realizar estudios químico-farmacológicos dirigidos al aislamiento e identificación de la o las sustancias responsables de la actividad hipoglucemiante, reportada a nivel empírico por la población y validada a nivel experimental para las plantas más usadas en el control de la diabetes. Por la magnitud del efecto hipoglucémico reportado, su vasta distribución en México y amplio uso popular como antidiabética, *Psacalium peltatum* se perfila como candidata idónea para ser investigada en esta dirección.

3.1. HIPÓTESIS

La actividad hipoglucemiante de las raíces de *Psacalium peltatum* se debe a la presencia de al menos una sustancia, la cual puede ser aislada utilizando una metodología extractiva, basada en el empleo de disolventes de diferente polaridad seguida de métodos cromatográficos, y químicamente caracterizada mediante métodos espectroscópicos.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio químico-farmacológico dirigido al aislamiento e identificación de la(s) sustancia(s) hipoglucemiante(s) de las raíces y rizomas de *Psacalium peltatum*.

3.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la influencia de la decocción acuosa de *Psacalium peltatum* sobre la glucemia de animales sanos y diabéticos.
- Obtener extractos orgánicos y acuosos de *Psacalium peltatum* y realizar su estudio farmacológico en animales sanos.
- Obtener las fracciones del extracto poseedor de la mayor actividad hipoglucemiante.
- Valorar farmacológicamente las fracciones obtenidas en animales sanos.
- Aislar y purificar los principios activos presentes en *Psacalium peltatum*.
- Realizar un estudio farmacológico del principio activo puro.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1 Animales de experimentación

420 ratones *Mus musculus* cepa CD-1, adultos, machos, de 25 a 35 g de peso corporal, alimentados con nutricubos purina y agua *ad libitum* y mantenidos en condiciones controladas de temperatura, humedad e iluminación (12:12).

4.1.2. Material vegetal

Psacalium peltatum se adquirió, de manera fresca, en el mercado de Sonora de la ciudad de México, D.F. Previa clasificación taxonómica, un ejemplar de herbario fue depositado en el herbario de plantas medicinales del Instituto Mexicano del Seguro Social (Herbario IMSS-M), con el número de registro 11490.

La planta se secó a la sombra (sin exposición directa a los rayos solares), a temperatura ambiente, durante 10 días. Posteriormente se separaron 3 kg de raíces de *Psacalium peltatum* y se colocaron en paquetes secos y limpios, para usarlas después de ser molida, en las investigaciones farmacológicas y químicas.

4.1.2.1. Preparación de las decocciones acuosas

40 g de raíces de *Psacalium peltatum* se hirvieron a fuego lento en 300 ml de agua durante 10 minutos. La decocción se enfrió a temperatura ambiente y se

filtró a través de gasa, desechándose el residuo sólido. El líquido filtrado se utilizó para los estudios farmacológicos.

4.2. ESTUDIO FARMACOLÓGICO

4.2.1. Ratones sanos

Se formaron 3 grupos de 10 ratones cada uno, los cuales se estudiaron después de 18 horas de ayuno, previamente a éste se les llenó los bebederos con agua potable, cambió las camas y trasladó al sitio de investigación.

Los ensayos farmacológicos se realizaron de la manera siguiente:

1. Toma de la muestra sanguínea y por corte transversal de la cola, se determinó la glucemia inicial (en ayunas) por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa.
2. Administración intraperitoneal de:
 - a) solución salina (SSI) a razón de 4 ml/kg de peso corporal
 - b) la decocción acuosa de *Psacalium peltatum* intraperitoneal a razón de 4 ml/kg de peso corporal.
 - c) Insulina regular (acción rápida) a razón de 0.4 UI/kg de peso corporal
3. Toma de muestra sanguínea y determinación de la glucemia al minuto 120 y 240.

4.2.2. Ratones diabéticos

Se les indujo diabetes experimental mediante la administración por vía intraperitoneal de 150 mg/kg de aloxana en tres ocasiones cada 48 horas.

Se formaron 3 grupos de 10 ratones diabéticos cada uno, a los cuales se les realizó el siguiente ensayo farmacológico:

1. Toma de muestra sanguínea por corte transversal de la cola y determinación de la glucemia basal (t = 0 min).
2. Administración intraperitoneal de la decocción acuosa de *Psacalium peltatum* a razón de 4 ml/kg de peso y de SSI en la misma dosis insulina (0.4 UI/kg)
3. Determinación de la glucemia al minuto 120 y 240.

4.3. OBTENCIÓN Y ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS

En un matraz balón de 1 L, equipado con un refrigerante en posición de reflujo, se colocaron 200 g de la planta seca y molida con 600 ml del disolvente (hexano, cloroformo, metanol o agua). La mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 4 horas. Posteriormente el extracto se filtró y los disolventes orgánicos se eliminaron a presión reducida en un rotavapor y el agua se liofilizó. Los extractos resultantes se pesaron. Para calcular los rendimientos obtenidos se consideró el peso total de la planta como el 100% y se aplicó una regla de tres simple tomando en cuenta el peso de cada extracto. La dosis administrada a los animales en estudio fue de 100 mg/kg de peso corporal.

Para evaluar la actividad hipoglucemiante de los extractos obtenidos se formaron 6 grupos de 10 ratones sanos cada uno: Grupo I - Solución salina isotónica, Grupo II - Aceite de maíz, Grupo III - Extracto hexánico, Grupo IV - Extracto clorofórmico, Grupo V - Extracto metanólico, Grupo VI - Extracto acuoso). Los estudios se realizaron de la forma ya descrita. Los extractos

hexánico y clorofórmico se resuspendieron en aceite de maíz, en tanto que los extractos metanólico y acuoso se resuspendieron en solución salina isotónica.

4.4 OBTENCIÓN Y ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS Y SECUNDARIAS DEL EXTRACTO METANÓLICO

El extracto metanólico, se sometió a una separación por cromatografía en columna empacada con sílica gel 60 y se eluyó con cloroformo, al cual se le fue aumentando la polaridad con metanol, se obtuvieron siete fracciones. La fracción FVII fue la que presentó la mayor actividad hipoglucemiante. Esta fracción se sometió a otra separación por cromatografía en columna utilizando como eluyente acetato de etilo, al cual se le aumentó la polaridad con metanol, se obtuvieron siete fracciones secundarias. De éstas solamente FSII y FSIII presentaron actividad hipoglucemiante. De ellas se obtuvo un sólido amarillo claro, el cual se filtró y se disolvió en metanol, la solución se calentó, enseguida se le agregó carbón activado y la mezcla se calentó durante 20 min. a temperatura de ebullición, una vez hecho esto se filtró en caliente, se obtuvo un sólido blanco que por cromatografía en placa fina muestra la presencia de dos compuestos, los cuales se sometieron a una separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo de líquidos Varian Modelo ProStar, acoplado a un colector de fracciones: se utilizó una columna preparativa C18, un loop de 100 μ l, como fase móvil una la mezcla de metanol:agua (50:50) a una velocidad de 4mL/min y un tiempo de corrida de 50 minutos. Se usó un detector de UV-Vis. La primera señal aparece al minuto 16 y la segunda al minuto 18.

A ambas fracciones secundarias (FSII y FSIII) se les realizó un análisis por cromatografía en placa fina, obteniendo en cada una de ellas una serie de compuestos, por lo que se analizaron nuevamente por HPLC en las condiciones descritas. Se observó la aparición de una gran cantidad de señales, que indican que los compuestos de las dos fracciones secundarias se descompusieron en el cromatógrafo de líquidos. Todo el procedimiento de extracción química se repitió con los mismos resultados.

El estudio farmacológico se realizó en la forma ya descrita para los extractos, se formaron 9 grupos para la investigación del efecto hipoglucémico de las fracciones primarias y 8 grupos para la investigación de las fracciones secundarias, las cuales fueron administradas por I.P. a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal.

4.5 EXTRACCIÓN ACUOSA Y AISLAMIENTO DE LA SUSTANCIA RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE

Las raíces secas y molidas de *Psacalium peltatum* (250 g) se extrajeron con 1 L de agua a 40°C durante 2 h; enseguida la mezcla se filtró y el agua del extracto acuoso se eliminó por liofilización. Se obtuvo un sólido café oscuro (rendimiento 2.0 %), el cual se cristalizó, cambiando su color a café claro. A la sustancia cristalizada se le llamó peltalosa.

Acetilación de peltalosa

En un vaso de precipitados de 25 ml se colocaron 200 mg de la peltalosa, 2 ml de piridina y 5 ml de anhídrido acético, la mezcla se mantuvo con agitación a

temperatura ambiente durante 12 h. El producto crudo se separó por cromatografía en columna empacada con silica gel. El acetato de peltalosa se obtuvo como un sólido beige.

2,4-dinitrofenilhidrazona de peltalosa

La peltalosa (300 mg) se disolvió en 5 ml de etanol; a esta solución se le adicionaron 4 ml de una solución al 10 % de 2,4-dinitrofenilhidracina en H_2SO_4 ; posteriormente, la mezcla se agitó durante 30 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo no se obtuvo algún sólido.

Métodos generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Scientific y no se corrigieron. La rotación óptica se obtuvo en un polarímetro Perkin Elmer Modelo 141 en una celda de 1 cm. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer FT Paragon 1000, en pastilla de KBr. Los espectros de 1H y ^{13}C RMN (resonancia magnética nuclear) se determinaron a temperatura ambiente en solución de $MeSO-d_6$ o $CDCl_3$ en un espectrómetro Varian Mercury a 400 MHz. Los desplazamientos químicos son relativos a los del $MeSO-d_6$ (2.49 ppm) o $CDCl_3$ (7.26 ppm). Intercambios de deuterio se llevaron a cabo para confirmar la asignación de los grupos hidroxilo. Experimentos de COSY (correlation spectroscopy), DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer) and HMQC (heteronuclear multiple-quantum correlation) también se llevaron a cabo en este espectrómetro.

4.6. ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LA PELTALOSA

La peltalosa a dosis de 50 y 100 mg/kg, previamente resuspendida en SSI, se administró a ratones CD-1 por vía intraperitoneal para las pruebas biológicas correspondientes, de la forma ya antes descrita para los extractos. Se formaron los grupos de ratones sanos, ratones con diabetes moderada y ratones con diabetes severa para probar las dosis mencionadas del principio activo puro, además de los controles con SSI e insulina regular, se agregó un control con tolbutamida a una dosis de 50 mg/kg, suspendida en SSI. De tal manera que se formaron 5 grupos para cada modelo experimental.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en cada una de las pruebas farmacológicas se sometieron a un análisis estadístico y se expresaron como media (\bar{X}) y error estándar de la media (E.E.M.). Para evaluar la diferencia entre los controles (ayuno, sol. salina isotónica, aceite de maíz e insulina) y las sustancias en estudio (preparación tradicional, extractos, fracciones y principios puros), se calculó la *t* de *Student*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. VALORACIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS DECOCCIONES ACUOSAS

DE *P. peltatum*

5.1.1 Ratones sanos

El descenso de la glucemia causado por la administración intraperitoneal de la decocción acuosa de *P. peltatum* fue de 2.8% en el minuto 120 y de 19.8% en el minuto 240. Sólo este último resultó ser estadísticamente significativo con respecto al valor basal y al control con solución salina y no tuvo diferencia estadísticamente significativa con respecto al descenso causado por la administración de insulina regular (Cuadro 1).

CUADRO 1. Efecto hipoglucémico de la decocción acuosa de las raíces de *Psacalium peltatum* sobre los niveles de glucosa de ratones sanos.

ESTUDIO	Glucemia mg/dL ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)		
	t = 0 min	t = 120 min	t = 240 min
SSI	47.7 \pm 2.8	48.4 \pm 2.1	45.8 \pm 2.9
<i>P. peltatum</i>	49.1 \pm 2.1	47.7 \pm 2.0	39.4 \pm 2.0 **
Insulina regular	47.4 \pm 3.0	38.7 \pm 2.9 *	36.4 \pm 2.3 **

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia inicial y al control : *p < 0.05, **p < 0.01

5.1.2 Ratones diabéticos

Los cuadros 2 y 3 muestran los resultados obtenidos con la administración de la decocción acuosa de esta planta a ratones con diabetes moderada y diabetes severa, respectivamente. En ellos se puede observar que *P. peltatum* causa reducción de la glucemia en el modelo de animales con diabetes moderada, pero no así en el modelo de diabetes severa. El descenso de la glucemia causado por la planta en los animales con diabetes moderada con respecto al valor inicial, fue de 18.5% en el minuto 120 y de 68.5% en el minuto 240 del estudio. Ambos descensos son estadísticamente significativos con respecto al control con SSI y a los valores basales. La glucemia de los animales con diabetes severa prácticamente no se modificó con la administración de la decocción acuosa de *P. peltatum*, ocurriendo lo mismo que con la administración de SSI al grupo control. En este grupo de animales, sólo la insulina fue capaz de disminuir la glucemia desde el minuto 120 del estudio, llevándola hasta valores normales al minuto 240.

CUADRO 2. Efecto hipoglucémico de la decocción acuosa de *Psacalium peltatum* en ratones con diabetes moderada.

ESTUDIO	Glucemia mg/dL ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)		
	t = 0 min	t= 120 min	t = 240 min
SSI	276.8 \pm 5.4	232.0 \pm 7.7	226.1 \pm 10.1
<i>P. peltatum</i>	198.7 \pm 3.7	161.9 \pm 6.3 *	62.5 \pm 5.5 **
Insulina regular	259 \pm 4.5	186.4 \pm 7.1*	78.8 \pm 6.2**

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia inicial y al control : * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$

CUADRO 3. Efecto hipoglucémico de las decocciones acuosas de *P. peltatum* en ratones con diabetes severa.

ESTUDIO	Glucemia mg/dL ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)		
	t = 0 min	t= 120 min	t = 240 min
SSI (control)	421.2 \pm 2.3	405.6 \pm 3.7	369.6 \pm 7.8
<i>P. peltatum</i>	366.8 \pm 3.3	423.8 \pm 5.0	354.2 \pm 11.7
Insulina regular	398.4 \pm 6.0	239.2 \pm 4.0*	101.0 \pm 3.5**

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a glucemia inicial y control : *p < 0.01, **p < 0.005

5.2 RENDIMIENTO Y VALORACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS *P. peltatum*

5.2.1 Rendimiento de los extractos

En el cuadro 4, se puede observar que el rendimiento de los extractos de *P. peltatum* fue, de menor a mayor, de 2.72% para el clorofórmico, 5.44% para el hexánico, 7.18% para el metanólico y 8.34% para el acuoso.

CUADRO 4. Rendimiento de los extractos de *P. peltatum* a partir de 200 g de planta seca y molida.

EXTRACTO	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
Hexánico	10.8	5.44
Clorofórmico	5.4	2.72
Metanólico	14.3	7.18
Acuoso	16.7	8.34

La determinación del rendimiento de extractos, obtenidos con los diferentes disolventes utilizados, es importante para calcular la cantidad de materia seca presente y poder establecer mejor las dosis a administrar a los animales en estudio.

5.2.2 Valoración farmacológica de los extractos

La administración intraperitoneal de los extractos hexánico, clorofórmico, metanólico y acuoso de *P. peltatum* por la misma vía a ratones sanos disminuyó la glucemia de éstos a los 120 minutos, sin embargo, sólo el descenso causado por los extractos metanólico y acuoso resultó ser estadísticamente significativo y fue superior al control correspondiente en 14.4 y 40.1% en el minuto 120 del estudio y en 13.3 y 35.3% en el minuto 240, respectivamente (Cuadro 5)..

CUADRO 5. Disminución de la glucemia en % causada por la administración intraperitoneal de los extractos de *Psacalium peltatum* en ratones sanos.

ESTUDIO	Glucemia basal mg/dL	% disminución de la glucemia ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)	
		t = 120 min	t = 240 min
		SSI	53.4 \pm 4.0
Aceite de maíz	56.0 \pm 5.1	17.3 \pm 4.7	28.6 \pm 2.9
Extracto Hexánico	51.9 \pm 2.5	27.7 \pm 3.7	55.6 \pm 4.7**
Extracto Clorofórmico	53.2 \pm 4.0	27.9 \pm 3.4	35.2 \pm 3.7
Extracto Metanólico	54.9 \pm 4.0	39.9 \pm 5.3*	58.4 \pm 8.6**
Extracto Acuoso	56.3 \pm 2.7	55.6 \pm 3.9***	70.8 \pm 3.7***

Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control : *p< 0.05, **p< 0.005, ***p<0.001

5.3. VALORACIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *P. peltatum*

Del extracto metanólico de *P. peltatum* se obtuvieron siete fracciones (FI-FVII). Los resultados obtenidos en el estudio de las tres primeras, las cuales se disolvieron en aceite de maíz se presentan en el cuadro 6, en tanto que los resultados de las otras cuatro fracciones, las cuales se disolvieron en SSI, se presentan en el cuadro 7. Sólo la fracción FVII causó descensos estadísticamente significativos de la glucemia en los dos tiempos estudiados (minutos 120 y 240), con respecto a los valores iniciales y a los valores del grupo control.

CUADRO 6. Valoración farmacológica de las fracciones primarias del extracto metanólico de *Psacalium peltatum* en ratones sanos.

ESTUDIO	Glucemia basal	Glucemia en mg/dL ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)	
	mg/dL	t = 120 min	t = 240 min
Aceite de maíz	67.4 \pm 2.5	72.0 \pm 5.3	58.4 \pm 2.7
FI	62.5 \pm 2.1	62.6 \pm 3.9	60.3 \pm 4.7
FII	65.6 \pm 2.9	63.1 \pm 3.2	55.8 \pm 2.2
FIII	55.2 \pm 2.9	66.5 \pm 4.5	46.2 \pm 3.8*

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia inicial y al control: *p < 0.05

CUADRO 7. Valoración farmacológica de fracciones primarias del extracto metanólico de *Psacalium peltatum* en ratones sanos.

ESTUDIO	Glucemia basal	Glucemia en mg/dL ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)	
	mg/dL	t = 120 min	t = 240 min
SSI	61.5 \pm 3.4	64.7 \pm 4.5	63.0 \pm 2.4
FIV	65.3 \pm 3.0	46.1 \pm 5.7*	72.3 \pm 7.0
FV	67.3 \pm 3.3	56.8 \pm 5.0*	69.2 \pm 4.6
FVI	61.1 \pm 4.2	68.0 \pm 5.9	70.3 \pm 5.5
FVII	75.3 \pm 4.1	51.3 \pm 2.7*	55.7 \pm 2.8*

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia inicial y al control: *p < 0.05

5.4. VALORACIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS FRACCIONES SECUNDARIAS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *P. peltatum*

De la fracción FVII del extracto metanólico se obtuvieron siete fracciones (FSI-FSVII); de ellas, sólo FSII y FSIII presentaron actividad hipoglucemiante estadísticamente significativa con respecto al valor inicial y no con respecto al control con SSI (Cuadro 8). Además de lo anterior, dichas fracciones se descomponen, lo cual impidió continuar con su investigación fármacológico-química, por lo que se recurrió al extracto acuoso para separar a la sustancia responsable de la actividad hipoglucemiante de *P. peltatum*.

CUADRO 8. Valoración farmacológica de las fracciones secundarias del extracto metanólico de *P. peltatum* en ratones sanos.

ESTUDIO	Glucemia basal	Glucemia en mg/dL ($\bar{X} \pm$ E.E.M.)	
	mg/dL	t = 120 min	t = 240 min
SSI (control)	61.1 \pm 1.9	59.5 \pm 4.1	55.4 \pm 4.0
SFI	46.0 \pm 2.6	50.1 \pm 3.2	49.1 \pm 5.8
SFII	65.1 \pm 4.8	55.2 \pm 2.7*	60.0 \pm 4.3
SFIII	66.8 \pm 3.8	56.8 \pm 2.4*	69.0 \pm 3.5
SFIV	52.3 \pm 2.3	54.8 \pm 4.1	57.2 \pm 4.8
SFV	65.0 \pm 4.0	64.4 \pm 4.3	63.4 \pm 3.8
SFVI	59.6 \pm 4.0	56.8 \pm 5.5	56.1 \pm 6.1
SFVII	60.0 \pm 2.3	68.7 \pm 6.1	63.6 \pm 5.9

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia basal: *p < 0.05

5.5 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA PELTALOSA

Del extracto acuoso se obtuvo un compuesto café claro al que se llamó peltalosa con un punto de fusión de 187-189°C, $[\alpha]_D^{20} = -310^\circ$ (c, 0.01, H₂O). Análisis calculado C₁₀H₁₈O₁₀: C, 40.27; H, 6.04. Encontrado: C, 39.93; H, 5.80. IR ν_{\max} 3388.3, 2923.1, 1433.5, 1384.6, 1034, 934.9 cm⁻¹.

No fue posible obtener el espectro de masas utilizando FAB (fast atom bombardment) como método de ionización, ya que la peltalosa se descompone bajo estas condiciones.

¹HRMN δ 3.59 (d, J = 15, 1H), 3.72 (d, J = 15 1H), 3.97 (t, J = 11.5, 1H), 4.13 (d, J = 11.5, 2H), 4.68 (s, 1H), 4.84 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.31 (s, 1H).

¹³CRMN δ 61.8, 74.39, 77.08, 81.68, 103.36.

Acetato de peltalosa. p.f. 73-75°C, $[\alpha]_D^{20} = -69$. Análisis calculado C₂₂H₃₀O₁₆: C, 48.00; H, 5.45. Encontrado: C, 47.92; H 5.21. IR ν_{\max} 3332, 2928, 1738, 1460, 1371, 1249 y 1049.

¹HRMN: δ 2.08 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 3.72 (d, 2H), 3.84 (d, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 5.4 (s, 1H).

¹³CRMN: δ 29.39, 29.55, 29.68, 63.82, 75.45, 75.80, 77.20, 103.72, 169.76, 170.10 y 170.67.

Este compuesto se preparó principalmente para determinar el peso molecular, sin embargo tampoco fue posible, debido a que por espectrometría de masas con FAB como método de ionización, el acetato también se descompone.

5.6 VALORACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA PELTALOSA

Los resultados obtenidos con la administración de peltalosa a ratones sanos y a ratones con diabetes moderada se muestran en los cuadros 9 y 10. La dosis de 50 mg/kg no causó descensos estadísticamente significativos durante el estudio, en cambio la dosis de 100 mg/kg sí causó descensos estadísticamente significativos en ambos modelos experimentales a los 120 y 240 minutos del estudio. En los ratones con diabetes moderada la glucemia basal promedio fue de 198.7 mg/dL, la cual disminuyó a 62.5 mg/dL a los 240 minutos del estudio o sea que tuvo un descenso de 68.5%, alcanzando niveles normales. Este descenso fue de mayor magnitud que el inducido por la administración de insulina. La hiperglucemia del grupo control con SSI se mantuvo sin cambios durante todo el estudio.

En el estudio de ratones con diabetes severa, con niveles promedio de glucosa en sangre en ayunas cercanos a 400 mg/dL, sólo la administración de insulina regular fue capaz de disminuirlos significativamente. La administración de peltalosa en las dosis de 50 y 100 mg/kg, así como la administración de tolbutamida a la dosis de 50 mg/kg, no indujo ningún descenso de ellos y, los niveles de la glucosa sanguínea durante el estudio no se diferenciaron de los niveles basales y tampoco se diferenciaron de los resultados obtenidos en el grupo control con SSI.

Cuadro 9. Efecto de la peltalosa sobre la glucemia de ratones sanos ($\bar{X} \pm \text{EEM}$).

Estudio	Glucemia basal (mg/dL)	Glucemia 2 h (mg/dL)	Glucemia 4 h (mg/dL)
SSI (control)	64.2 \pm 3.9	60.5 \pm 2.3	60.1 \pm 2.8
Tolbutamida (50 mg/kg)	61.8 \pm 4.0	55.7 \pm 4.0	51.1 \pm 4.0*
Peltalosa (50 mg/kg)	65.5 \pm 6.1	62.8 \pm 3.6	61.2 \pm 4.3
Peltalosa (100 mg/kg)	62.2 \pm 6.5	51.1 \pm 4.0*	49.6 \pm 5.5*
Insulina regular (0.1 U.I./kg)	68.3 \pm 5.0	52.9 \pm 3.5*	47.1 \pm 6.5**

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia basal y el control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Cuadro 10. Efecto de la peltalosa sobre la glucemia de ratones con diabetes moderada ($\bar{X} \pm \text{EEM}$).

Estudio	Glucemia basal (mg/dL)	Glucemia 2 h (mg/dL)	Glucemia 4 h (mg/dL)
Sol.sal.isotónica (control)	255 \pm 12.5	252 \pm 10.3	248 \pm 4.0
Tolbutamida (50 mg/kg)	258 \pm 7.5	230 \pm 8.0	217.2 \pm 6.5*
Peltalosa (50 mg/kg)	253 \pm 10.0	248 \pm 8.5	250 \pm 6.0
Peltalosa (100 mg/kg)	198.7 \pm 3.7	161.9 \pm 6.3*	62.5 \pm 5.5**
Insulina regular (0.1 U.I./kg)	268 \pm 8.5	197.4 \pm 8.0*	168 \pm 6.5*

Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la glucemia basal y el control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5.7 DISCUSIÓN

La población mexicana utiliza el *Psacalium peltatum* para el control de la diabetes mellitus tipo 2, preparándolo de la manera siguiente: 150 gramos de la raíz seca de la planta son hervidos a fuego lento durante 10 minutos, de la decocción resultante después de enfriarse a temperatura ambiente es separada la parte líquida, la cual es bebida por el paciente a razón de un vaso o tasa de 200 - 250 ml antes de los alimentos, tres veces al día.

Los resultados de la investigación farmacológica de la decocción acuosa en ratones sanos y en ratones con diabetes moderada, preparada de la misma manera como es preparada por la población, permiten convalidar el efecto hipoglucémico que ésta le atribuye en forma empírica y concuerdan con los resultados publicados por Román-Ramos y col. (1991, 1992a, 1992b), Alarcón-Aguilar (1993, 1997, 1998) en otras especies animales.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, obtenidos en ratones sanos y en ratones con diabetes moderada y severa, se puede deducir que el mecanismo de la acción hipoglucemiante de la planta en estudio es parecido al de los agentes hipoglucemiantes orales, pues necesita de la insulina endógena, presente en los modelos experimentales citados. En los animales con diabetes severa, carentes de dicha hormona, *P. peltatum* es incapaz de disminuir la hiperglucemia y sólo la administración de insulina exógena lo hace, tal y como sucede en los pacientes con diabetes mellitus tipo 1. Para establecer el mecanismo fino de acción hipoglucemiante del *P. peltatum* es necesario realizar la investigación correspondiente y, sólo de esa manera podrá establecerse si actúa como las sulfonilureas, biguanidas o tiazolidinedionas. El mecanismo de acción de los

inhibidores de las α -glucosidasas, los cuales actúan en el tracto gastrointestinal, no puede ser descartado, debido a que los modelos experimentales empleados en la presente investigación excluyen la vía oral utilizada por la población. La vía de administración empleada fue la intraperitoneal, por su facilidad técnica, inducción de menor estrés en los animales en estudio y mejor biodisponibilidad farmacológica, que llevan a una mejor reproducibilidad de los resultados.

El efecto hipoglucémico de *P. peltatum* detectado únicamente en los animales sanos y con diabetes moderada y la ausencia de dicho efecto en los animales con diabetes severa, explica porqué esta planta es usada como remedio popular sólo en el control de la DM tipo 2 y no es usada en el control de la DM tipo 1. Sin embargo, para que la población pueda utilizarla como remedio popular en forma más segura y evitar probables efectos indeseables, hace falta que se realice más investigación al respecto, lo mismo que para establecer la duración del efecto terapéutico, así como la dosificación óptima.

Los resultados de la presente investigación únicamente permiten convalidar el efecto hipoglucémico de la preparación tradicional de la decocción acuosa de *P. peltatum*, sin embargo no se debe recomendar su uso sin que se realicen previamente los estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica. En plantas del mismo género, por ejemplo *Psacalium decompositum*, ha sido reportada la presencia de alcaloides pirrolicidínicos, los cuales tienen actividad hepatotóxica, carcinogénica y mutagénica a nivel experimental (Kapadia y col., 1990; Plaa, 1991). Tomando en cuenta lo anterior, el control de la diabetes mellitus con remedios de *P. peltatum*, al igual que de *P. decompositum* y de otras plantas del

género de los senecios, al cual pertenecen las plantas del "complejo" matarique (plantas conocidas popularmente como matarique), descrito por Bye y col. (1995), puede ser peligroso para la salud.

El efecto hipoglucémico detectado en la decocción acuosa de *P. peltatum* se conservó en los extractos metanólico y acuoso, siendo de mayor magnitud en este último. Lo anterior significa que que la o las sustancias responsables de dicha actividad son de naturaleza polar. Del extracto acuoso se logró aislar por primera vez e identificar la sustancia responsable de la actividad farmacológica, a la cual se le denominó *peltalosa*.

La *peltalosa* se identificó como 2,6-anhidro-5-ulopiranososa (figura 2). Este compuesto contiene grupos hidroxilo (3388 cm^{-1}) y un grupo éter (1034 cm^{-1}). Por análisis elemental se determinó que la fórmula molecular es $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$.

Las señales de $^1\text{HRMN}$ a δ 4.68, 4.84, 5.30 y 5.31 se asignaron a cuatro grupos oxidrilo. De acuerdo a los espectros COSY y HMQC, los dobletes a δ 3.87 ($J = 11.5\text{ Hz}$) y δ 4.13 ($J = 11.5\text{ Hz}$) se asignaron a H-4 y H-3 y se correlacionaron a C-4 (74.4 ppm) y C-3 (77.1 ppm), respectivamente. El triplete a δ 3.72 ($J = 15\text{ Hz}$) corresponde a H-2, el cual está unido a C-2 (81.7 ppm). Cada una de estas señales integra para un protón. El doblete a δ 3.59 ($J = 15\text{ Hz}$) integra para dos protones, teniendo una correlación con C-6 (61.8 ppm) del grupo hidroximetileno.

Las constantes de acoplamiento grandes entre H-4 y H-3 sugieren que estos protones son axiales. También los protones H-3 y H-2 son trans, ya que los valores de J son mayores de 10, lo cual es típico para los protones trans-diaxial en un anillo de pirano con conformación de silla (Hesse y col., 1997).

El espectro de $^{13}\text{C}(\text{DEPT})\text{RMN}$ indica que la peltalosa contiene tres CH a δ 74.4, 77.1 y 81.7, un CH_2 a δ 61.8 y un carbono cuaternario (δ 103.4 ppm).

El espectro de $^1\text{H}\text{RMN}$ del acetato de peltalosa presentó una señal a δ 5.4 que desapareció con D_2O , por lo que puede asignarse al protón de un oxidrilo terciario, ya que estos grupos no pueden ser acetilados (Greene y Wuts, 1991). El espectro de $^{13}\text{C}\text{RMN}$ presentó tres señales a δ 169.76, 170.10 y 179.67, las cuales se asignaron a los tres grupos carbonilo de los acetatos. De acuerdo a la conectividad de los espectros COSY y HMQC, las tres señales a δ 2.08, 2.09 y 2.11 se correlacionaron a los grupos metilo de los acetatos a δ 29.38, 29.56 y 29.69, respectivamente. Los dobletes a δ 4.19 y 3.84 se asignaron a H-4 y al protón del grupo hidroximetileno respectivamente y están unidos a C-4 (77.2 ppm) y C-6 (63.82 ppm). Los multipletes a δ 3.84 y 4.38 fueron designados para H-2 y H-3 respectivamente y correlacionados con C-2 (75.45 ppm) y C-3 (75.80 ppm).

La peltalosa es un carbohidrato, sin embargo, no formó 2,4-dinitrofenilhidrazona, lo cual sugiere que este compuesto no tiene carbonos anoméricos libres.

Los resultados obtenidos permiten proponer para la peltalosa la estructura que se muestra en la figura 2. Cabe mencionar que tratándose de un carbohidrato, es de esperar que carezca de la actividad hepatotóxica, carcinogénica y mutagénica que podría poseer la decocción acuosa de plantas del género de los senecios. Consideramos necesario subrayar que esta estructura no había sido reportada con anterioridad y que constituye el aporte principal de la presente investigación, por lo que se procedió a la escritura del artículo correspondiente, el cual fue enviado a publicación a una revista internacional especializada.

Los resultados obtenidos con la administración de la peltalosa son muy parecidos a los obtenidos con la decocción acuosa de la planta en estudio, corroborándose que el principio activo del *Psacalium peltatum* sólo tiene actividad en animales sanos y en animales con diabetes moderada, en los cuales hay insulina endógena, en cambio en los animales con diabetes severa, carentes de esta hormona no hay actividad.

Tomando en cuenta lo anterior, a partir de la peltalosa, previos estudios farmacológicos y toxicológicos correspondientes, es posible desarrollar un nuevo medicamento hipoglucemiante oral para el control de los pacientes con DM tipo 2, al cual pertenece alrededor del 90% de los pacientes con esta enfermedad.

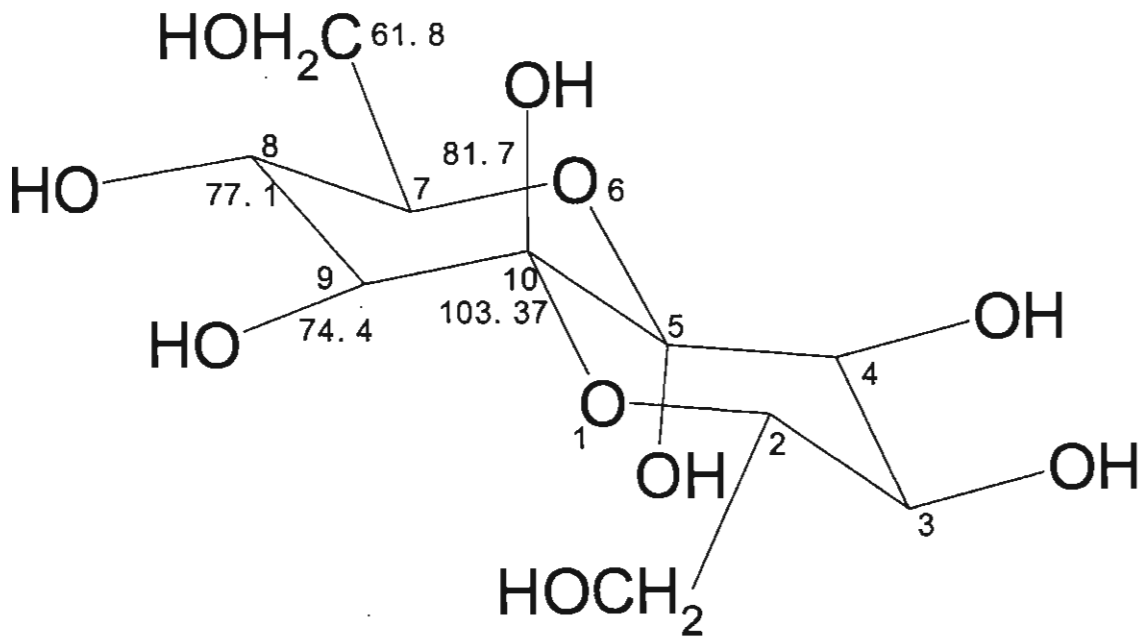


Figura 2. Estructura de la peltalosa.

6. CONCLUSIONES

- Se convalidó experimentalmente el efecto hipoglucémico atribuido en forma empírica por la población mexicana a la decocción acuosa de *Psacalium peltatum*.
- El extracto acuoso de la planta fue el poseedor del efecto hipoglucémico de mayor intensidad.
- Una nueva ulopiranosida, a la que se le llamó peltalosa, resultó ser la sustancia responsable de la actividad hipoglucemiante presente en la preparación tradicional de *Psacalium peltatum*.
- La peltalosa disminuyó en 62.5% la glucemia en animales con diabetes moderada, llevándolos a niveles normales 4 horas después de administrada.
- La acción hipoglucemiante de la peltalosa es mediada por la insulina, por lo que sólo debe ser administrada para el control de la diabetes mellitus, cuando todavía haya producción endógena de dicha hormona.
- La peltalosa, previa investigación preclínica y clínica, puede ser empleada eficazmente en el control de la diabetes mellitus tipo 2.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abourizk N y Dunn (1990). Types of diabetes according to National Diabetes Data Group Classification. *Diabetes Care* **13** : 1120-1123.

ADA (American Diabetes Association) (1997). Test of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* **20** (Suppl. 1): 18 - 23.

Alarcón Aguilar FJ (1990). Investigación del efecto hipoglucémico de plantas usadas por la población mexicana en el control de la diabetes mellitus. Tesis de Maestría en Biología Experimental. Div. C.B.S., UAM-I. México. 136 p.

Alarcón Aguilar FJ (1997). Investigación experimental de la acción hipoglucemiante de plantas usadas en el control de la diabetes mellitus. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Div. CBS, UAM-I. México. 181 p.

Alarcón Aguilar FJ, Román Ramos R, Flores Saenz JL (1993). Plantas medicinales usadas en el control de la diabetes mellitus. *Ciencia* **44**: 363-381.

Alarcón Aguilar F, Román Ramos R, Reyes Chilpa R, Jimenez M, Gonzalez B, and Flores Saenz JL 1997 ():effects of three mexican medicinal plants (asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J Ethnopharmacol* **55**:171-177.

Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R, Perez-Gutierrez S, Aguilar-Contreras A, Contreras-Weber CC, Flores Saenz JL (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetic. *J Ethnopharmacol* **61**:101-110.

Akhtar MS y Ali MR (1985). Study of hypoglycaemic activity of *Cumminum nigrum* seeds in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Medica* **51**: 81-85.

Alberti KB. (1997). The costs of insulin-dependent diabetes. *Diab Med* **14**: 7-9.

Ali-Ajabnoor M y Karim TA. (1988). Effect of *Trigonella foenum-graceum* on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice. *J Ethnopharmacol* **22**: 45-49.

ANM (Academia Nacional de Medicina, México) (1997). Hipoglucemiantes de acción intestinal. *Revisiones Bibliográficas para el Médico General*. 2(4) : 37-39.

Arreola Ortiz JF, Partida-Hernández G (2002). Etiopatogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1. En: *Diabetes Mellitus* de Islas-Andrade S y Lifshitz-Guinzberg A. McGraw-Hill Interamericana. 2ª. Edición. pp. 59-66.

Atta-ur-Raman y Zaman K. (1989). Medicinal Plants with hypoglycemic activity. *J Ethnopharmacol* 26: 1-55.

Ayala A. (1990). Complicaciones agudas de la diabetes mellitus: fisiopatología y tratamiento. *Gaceta Médica de México* 126: 385-391.

Bailey J y Day C(1989). Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 12: 553-554.

Baliga BS, Fonseca VA (1997). Recent advances in the treatment of type II diabetes mellitus. *Am Pharm Physician* 55:817-824.

Banting FG, Best CH (1922). Internal secretion of the páncreas. *J Lab Clin Med* 7: 251-256.

Barrera-Escorcia E, Muñoz-Torres A, Vilches-Flores A, Fregoso-Padilla M, Martínez-Aguilar J, Castillo-Padilla I, Vargas-Vera A, Mendez JD, Betancourt-Rule M, Román-Ramos R (2005) Clinical evolution of diabetes rats after transplant of electrofused pancreatic islet cells and dermic cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (in press).

Blanco de la Mora E. (1995). Complicaciones de la diabetes mellitus. *Mundo Médico*, Nov. (Núm. esp) :73-82.

Brennan A (1996). Diabetes mellitus: Biomedical health education/promotion approach. *Br J Nurs* 5:1060-1064.

Bye R, Linares E, Estrada E (1995). Biological diversity of medicinal plants in México. Chapter four. In: JT Arnason y colaboradores (Eds) *Phytochemistry of medicinal plants*. Plenum Press, New York. P. 65.

Caádel VJ (1973). Libro de Diabetes. Editorial Rocas. Barcelona, España. Pp. 40-45.

Caballero J (1987). Etnobotánica y desarrollo. La búsqueda de nuevos recursos vegetales. En: Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Botánica. Medellín, Colombia. 1987, pp. 79-95.

Capasso F. (1985). Medicinal Plants : an approach to the study of naturally occurring drugs. *J Ethnopharmacology* **13** : 11-114.

Capasso F, Balestrieri B y Mascolo N. (1980). Actualidad de las plantas medicinales. *Medicina Tradicional* (México). **3** (10) 53-61.

Chanse RE, Frank BH (1993). Rsearch, development, production and safety of biosynthetic human insulin. *Diabetes Care* **16** (Suppl. 3): 133-142.

Charbonnel B, Dormandy J, Erdmann E, Massi-Benedetti M (2004). The prospective pioglitazone clinical trial in macrovascular events (PROactive). *Diabetes Care* **27**: 1647-1653.

Chenault AM. (1979). The terapia of diabetes. *Am Scientist* **67**: 422-431.

Committee Report (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **20**: 1183 - 1197.

Committee Report (2003). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **26**: S5-S20.

Crabbe MF. (1987). "The complications of diabetes". *Diabetic Complications. Scientific and Clinical Aspects*. M Jamez y col. Ed. (Churchill, Livingstone) pp. 1-23

Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA (1996). Meabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in non insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **81**: 4059-4067.

Derot, M and Tchobroutsky, G. (1970). The importance of diet in the treatment of diabetes mellitus. In: Proceedings of the seventh congress of the international diabetes. Editado por Rodríguez, RR., Buenos Aires, Argentina. pp. 99-112.

Faber OK, Beck-Nielsen H, Binder C (1990). Acute action of sulphonylurea drugs during long term treatment of NIDDM. *Diabetes Care* **13**: 26-31.

Farnsworth N, Akerele O, Bingel A. (1989). Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bol Sanit Panam* **107**: 314-329.

Flores-Saenz JL, Mendez JD, Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R (2003). Crossover and double blind study with metformin and rosiglitazone in impaired glucose tolerance subjects. *Proc West Pharmacol* **46**:143-147.

Gait MJ (1979). Synthetic genes for human insulin. *Nature* **277** : 429.

García-García E (1997). Biguanidas. En: *Tratado de Diabetología* de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición. México, pp. 486-496.

Gerich JE. (1996). Pathogenesis and treatment of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus (NIDDM). *Horm Metabol Res* **28**: 404-412.

Glombik H (1986). Oral antidiabetics. *Prog. Drug Res* **30** : 281- 343.

Gómez-Díaz R., Villaseñor-Ruiz, Gómez-Pérez FJ (1997). Etiopatogenia, historia natural y factores predictivos en la diabetes mellitus tipo I. En: *Tratado de Diabetología* de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición (México) pp. 259-271.

Gómez-Vargas E (1997). Diabetes asociada con otras condiciones y síndromes. En: *Tratado de Diabetología* de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición. México, pp. 333-349.

Greene WT, Wuts GMP (1991). *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Willey & Sons, New York, p88.

Gulías-Herrero A, Contreras-Rodríguez JL (1997). Transplante de páncreas. En: *Tratado de Diabetología* de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición. México, pp. 561-571.

Head J y Fuller JH. (1990). International variations in mortality among diabetics patients: The Who Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics. *Diabetología* **33**: 477-481.

Hernandez-Galicia E, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaría L, Roman-Ramos R, Chavez-Miranda AA, Garcia-Vega LM, Flores-Saenz JL, Alarcon-Aguilar FJ (2002). Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proc West Pharmacol Soc* **45**:118-124.

Hesse M., Meier H., Zeeh B (1997). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 5nd ed., Edition., Thieme, Stuttgart. p107-9.

Husni AAT, Keri A y Al-Khazraji N. (1983). Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*. *J Ethnopharmac* **9**: 299-314.

Inouye K. (1979). Enzyme-assisted semisynthesis of human insulin. *Diabetología* **16** (3): 141-150.

Islas-Andrade S y Lifshitz-Guinzberg A (2002). Patogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes tipo 2. En: *Diabetes Mellitus* de Islas-Andrade S y Lifshitz-Guinzberg A. McGraw-Hill Interamericana. 2ª. Edición. pp. 71-78.

Ivorra M, Payá H y Villar A. (1989). A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *J Ethnopharmacol* **27**: 243-275.

Iwasaki Y, Kondo K, Muraset T. (1996). Osmoregulation of plasma vasopressin in diabetes mellitus with sustained hyperglycemia. *J Neuroendocrinol* **8**: 755-760.

Jonasson O. (1979). Transplantation of the pancreas. *Transplant Proc* **11**: 325-330.

Judzewitsch R, Pfeifer A, Best D, Beard C. (1982). Chronic chlorpropamide therapy of non insulin-dependent augments basal and stimulated insulin secretion by increasing islet sensitivity to glucose. *J Clin Endocrinol. Metab* **55** : 321-328.

Kamani HT, Jeevathayaparan S, Preethika A, Karanunanayake E (1994). Effect of *Momordica charantia* and key hepatics enzymes. *J Ethnopharmacol* **44**: 93 - 97.

Kapadia G, Ramdass A, Bada F (1990). Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio glabellus*. *Int J Crude Drugs Res* **28**. 67-71.

Karunanayake E, Jeevathayaparan S, Tenekoon KH. (1990). Effect of *Momordica charantia* fruit juice on streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol* **30** : 199 - 204.

Lamela M, Cadavid L, Calleja M. (1986). Effects of *Lythrum salicaria* extract on hyperglycemic rats and mice. *J Ethnopharmacol* **15** : 153 - 160.

Larsen JJS, Dela F, Kjaer M, Galbo H (1997). The effect of moderate exercise on postprandial glucose homeostasis in NIDDM patients. *Diabetologia* **40**: 447-453.

Lebovitz H, Dole JF, Patwardhan R, Pappaport EB, Fred MI (2001). Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 280-288.

Lisker-Yorkowitsky R, Mutchinik Baringoltz (1997). Genética de la diabetes mellitus no insulinodependiente. En: *Tratado de Diabetología* de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición (México) pp. 191-216.

Loubatieres A (1957). The hipoglucemic sulfonamides: history and development of the problem from 1942 to 1955. *Ann NY Acad Sci* **71** : 4-11.

- Lozoya M (1980). Antecedentes históricos de la diabetes mellitus. *Med Trad (México)* **10**: 5-8.
- Lozoya X (1985). Medicina Tradicional y Herbolaria... ¿Por qué? *Rev Méd IMSS* **23**:85-87.
- Lozoya X (1987). Medicina Tradicional y Salud en México. *Gac Méd México* **123**: 281-285.
- Martens FMAC, Visseren FLJ, Lemay J, de Koning EJP, Rabelink TJ (2004). Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* **62**: 1463-1480.
- Martínez I (1980). *Etnobotánica mexicana de plantas popularmente usadas para el tratamiento de la diabetes*. Tesis Profesional. UNAM, México.
- Medow MA (1997). Use of glycosilated hemoglobin levels for diagnosis of diabetes mellitus (letter). *J Am Med Assoc* **277**: 211.
- Mering VM, Minkowski O (1889). Diabetes mellitus nach pancreas extirpation. *Arch Exp Path Pharmacol (Berlin)* **2**. 202-203.
- Meza-Mendoza SC, Fanghanel-Salmón A y Gutiérrez-Gutiérrez R (1997). Transplante de islotes pancreáticos. *Rev Endocrinol y Nutr* **5** (2): 27-32.
- Molitch M. (1989). Diabetes mellitus. Control and Complications. *Postgrad Med* **85**: 182-194.
- Nelson R (1988). Oral glucose tolerance test: indications and limitations. *Mayo Clin Proc* **63**: 263-269.
- Plaa G (1991). Toxic responses of de liver. In: Amdur M, Doull J, Kaassen C (Eds.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basis Science of Poisons. Pergamon Press. New York, p. 345.
- Reemtsa K, Weber C, Di-Sunger F (1979). Organ culture studies for pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc* **11**: 1002-1010.
- Rodríguez-Saldaña J, Sosa-Espinosa P, García Martínez A (1994). Epidemiología de la diabetes mellitus en México. Pasado, presente y futuro. *Rev Fac Med UNAM* **37**: 15 -28.
- Roman-Ramos R., Alexiyeu YuP, Kulik VP (1979). Prospects in the treatment of diabetes mellitus patients: artificial pancreas, graft of the Langerhans islets, and transplantation of the pancreas. *Problemi Endocrinology (Moscow)* **25** (1): 81-92.

Roman-Ramos R, Aliexievskij YG, Kulik VP (1981) Segmental transplantation of the pancreas from a living donor. *Khirurgiia* (Mosk.) **12** (12):50-54.

Román Ramos, R. (1984). Diabetes mellitus: Lo que todos necesitamos saber. *Amistad, ciencia y cultura, México-URSS* **1**: 123-143.

Román Ramos R, Flores Saenz JL, Partida Hernandez G, Lara Lemus A, Alarcón Aguilar F (1991). Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch Invest Med* (México) **22**: 87-97.

Román Ramos R, Alarcón Aguilar F, Lara Lemus L, Flores Saenz JL (1992a). Hypoglucemic effect of plants used in Mexico as antidiabetic. *Arch Med Res* **23**: 59-64.

Román Ramos R, Lara Lemus A, Alarcón Aguilar F, Flores Saenz JL (1992b). Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch Med Res* **23**: 105-109.

Roman Ramos R, Flores Sáenz JL, Trujillo Arriaga HM, Alarcón Aguilar FJ (2000). Normalización de la tolerancia a la glucosa con rosiglitazona. *Investigación Médica Internacional* **27**(1): 9-14.

Roth M (1983). "Glycated Hemoglobin". Not Glycosylated or Glucosylated. *Clin Chem* **29**: 1991-1994.

Rubin RR, Peyrot M, Saudek CD (1989). Effect of diabetes education on self-care, metabolic control, and emotional well being. *Diabetes Care* **10**: 673-679.

Rull-Rodrigo JA. (1997). Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. En: Tratado de Diabetología de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición. México, pp. 173-190.

Rzedowski J, Rzedowski GC. (1987). Flora fanerogámica del valle de México. Esc. Nal. Ciencias Biológicas IPN. Instituto de Ecología. México. vol II, p. 296.

Sánchez-Corona J., García-Cruz D., Bravo-Cuéllar A (2002). Genética de la diabetes mellitus. En: *Diabetes Mellitus* de Islas-Andrade S y Lifshitz-Guinzberg A. McGraw-Hill Interamericana. 2ª. Edición. pp.41-56

Saudek CD, Duckworth WC, Grobbee Hurder A, Henderson EG (1996). Implantable insulin pump vs. multiple dose insulin for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Med Assoc* **276** : 1322-1325.

Singer D, Coley C, Samet J, Nathan D (1989). Tests of glycemia in diabetes mellitus. Their use in establishing a diagnosis and in treatment. *An Int Med* **110**: 125-137.

Stout RW. (1979). Diabetes and atherosclerosis. The role of insulin. *Diabetologia* **16**: 141-150.

Stocker W (1966). Aportación de la Historia de la Diabetes Mellitus. Editorial Therapiewoche. Buenos Aires, Argentina. Pp. 102-163.

Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE (1995). Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N England J Med* **333**: 550-554.

Sutherland DE (1981). Pancreas and islet transplantation. Y. Experimental studies. *Diabetologia* **20**: 161-181.

Taylor R, Agius L. (1988). The biochemistry of diabetes. *Biochem J* **250**: 625-640.

Tchobrousky G (1991). Blood glucose levels in diabetic and non diabetic subjects. *Diabetologia* **34**: 67-73.

Trujillo Arriaga H, Román Ramos R, Alarcón Aguilar F, Carrasco Sosa S (1996) Glucemia máxima en la prueba de tolerancia a la glucosa. *Rev Mex Ing Bioméd* **17**(1):13-20.

Trujillo-Arriaga HM, Roman-Ramos R (2004a) Does a single time function adequately describe blood glucose concentration dynamics during an OGTT? *J Med Hypothes* **62**: 53-61.

Trujillo-Arriaga HM, Roman-Ramos R (2004b) The impaired hyperglycemic peak as an additional indicator of Type 2 diabetes development is misdetected. *J Med Hypothes* **62**: 268-274.

Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* **281**: 2005-2012.

Unger R, Foster D (1998). Diabetes Mellitus. In: Williams Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Company. 8th Edition. Pp.1255-1320.

Vargas-Alarcón GG, Granados-Arriola J (1997). Inmunogenética de la diabetes insulín dependiente. En: *Tratado de Diabetología* de Gómez-Pérez FJ y Rull-Rodrigo JA. Instituto Nacional de la Nutrición (México) pp. 277-284.

Vigneri R, Pezzino V, Wong Y. (1982). Comparison of the in vitro effect of biguanides and sulfonilureas on insulin binding to its receptor in targets cells. *J Clin Endocrinol Metab* **54** : 95-99.

Vinik AI, Richardson DW (1997). Implications of the diabetes control and complications trial for persons with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *South Med J* **90**: 268-282.

Warren SG (1983). Aotic Pharmacognosia II. *Oplopanax horridus* *J Ethnopharmacol* **7**: 313 -320.

Watkins J. (1980). Insulin infusion systems, diabetic control and microvascular complications. *Br Med J* **280**: 350-352.

White JR (1996). The pharmacological management of patients with type II diabetes mellitus in the era of new oral agents and insulin analogs. *Diabetes Spectrum* **9**: 227-234.

Zárate TA, Cervantes G. (1987). Un programa nacional para la detección y tratamiento de la diabetes mellitus. *Gac Méd* **123**: 203-211.

8. ANEXOS

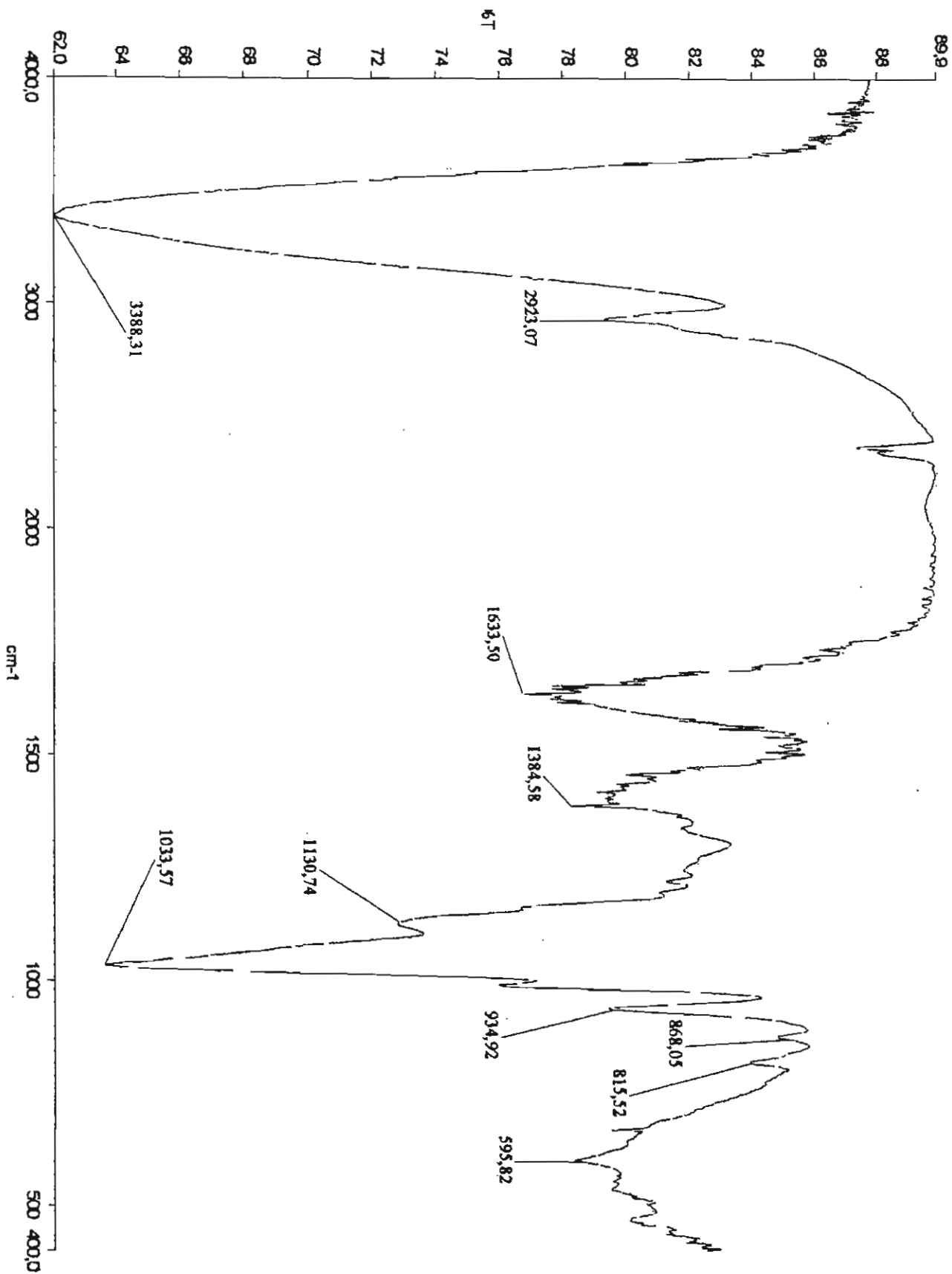


Figura 3. Espectro de IR de la peltalosa

Figura 4. Espectro de ^1H RMN de la peltalosa

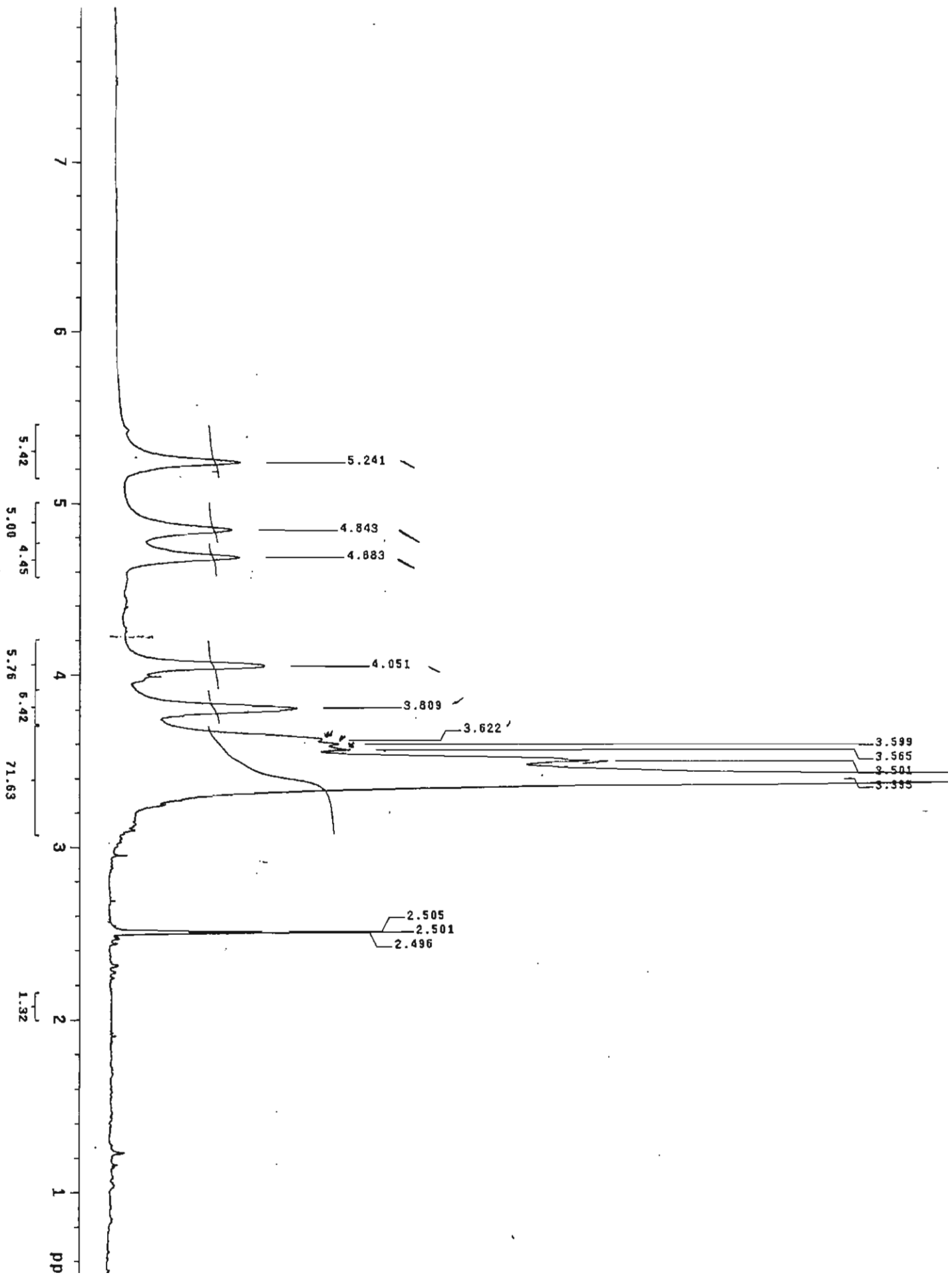
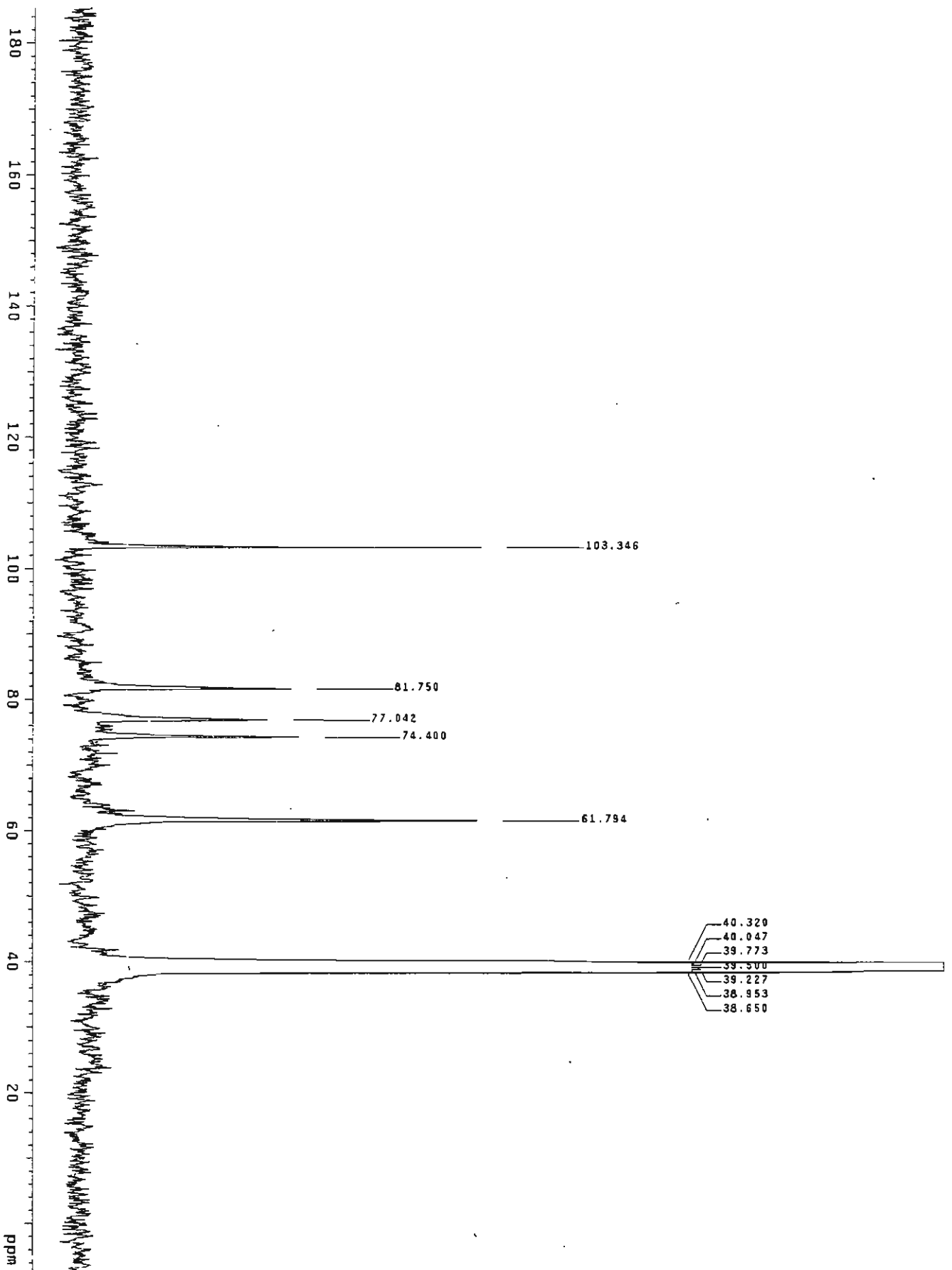


Figura 5. Espectro de ^{13}C RMN de la peltalosa



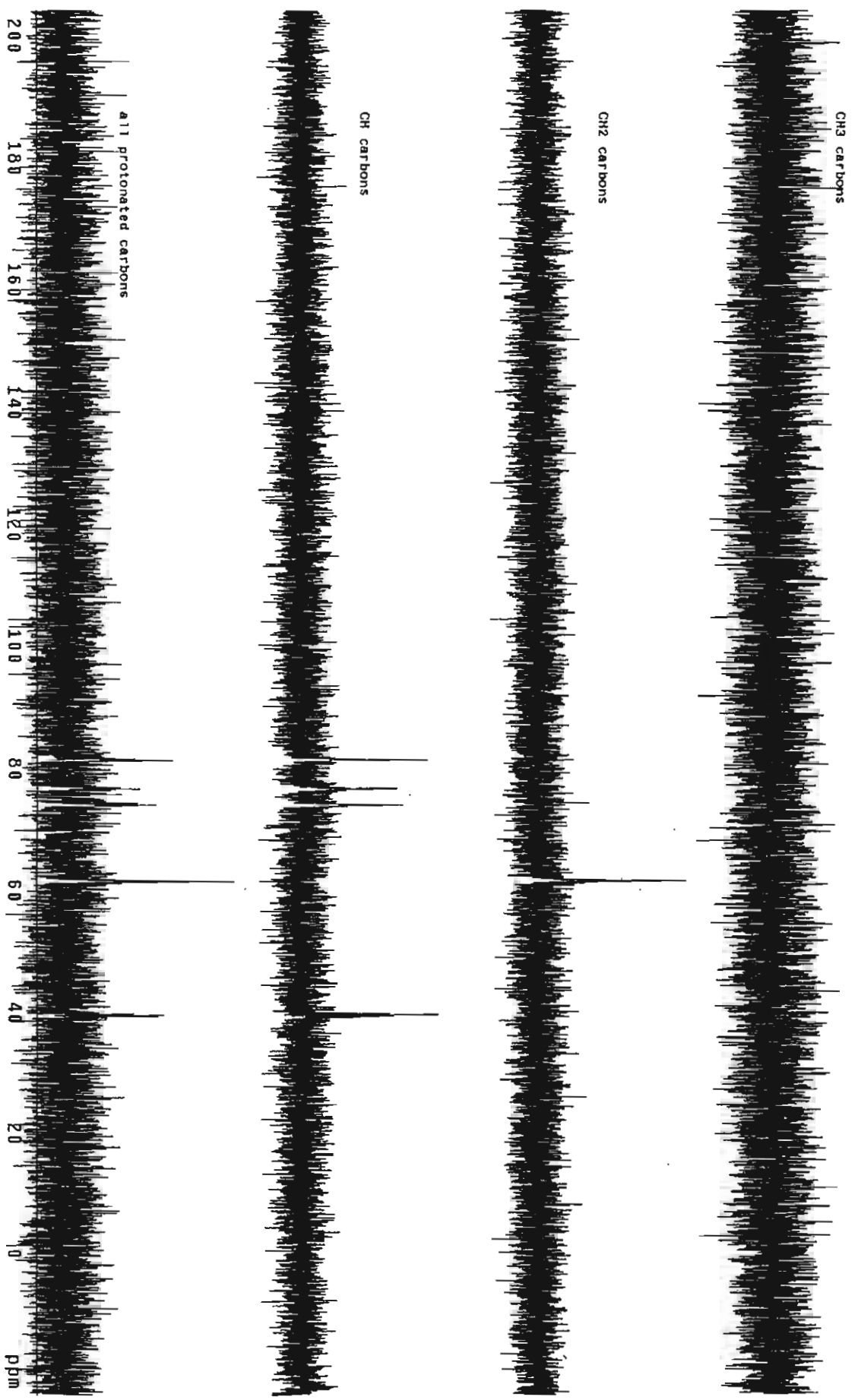
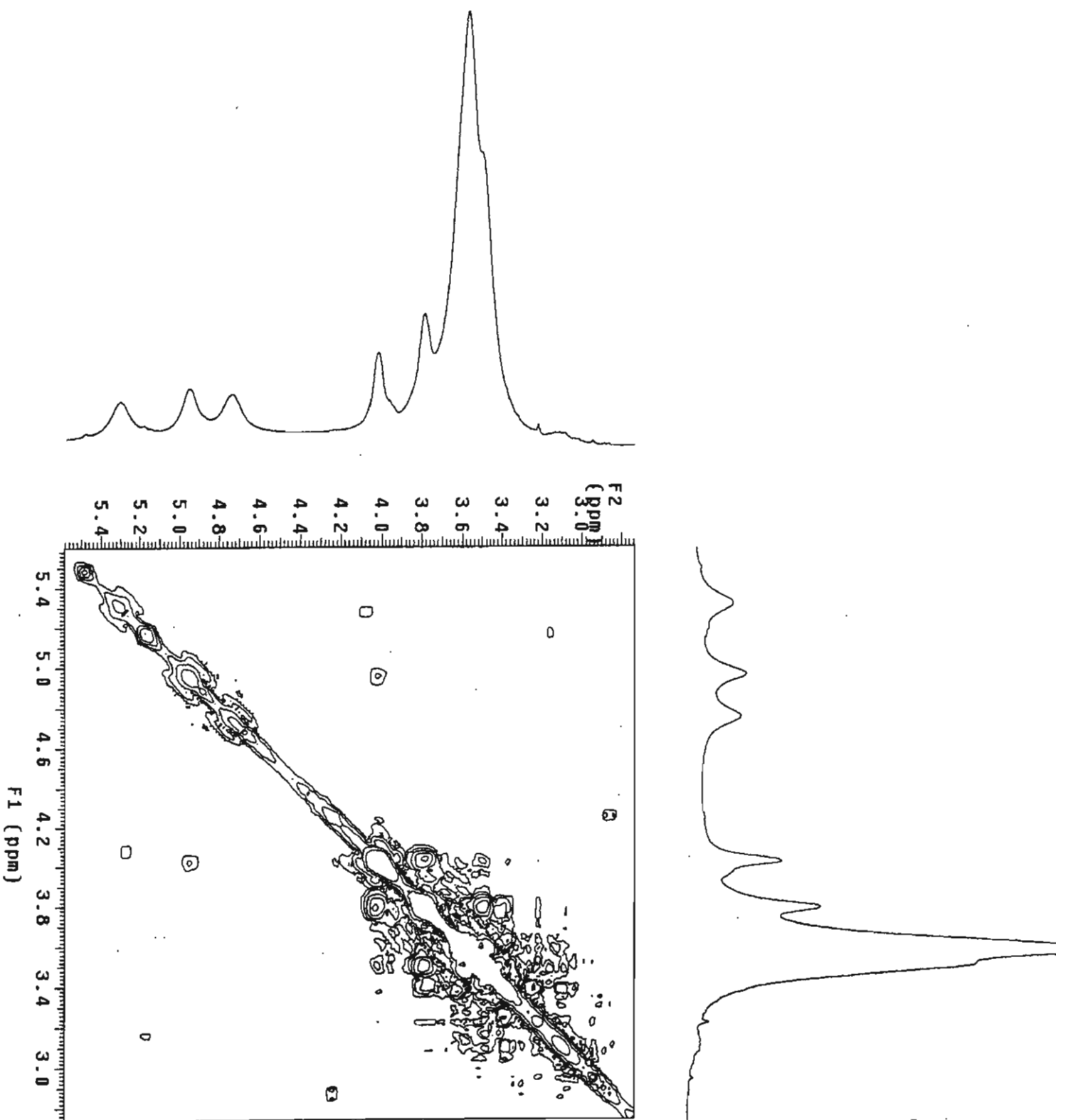


Figura 6. Espectro DEPT de la peltalosa

Figura 7. Espectro COSY de la peltalosa



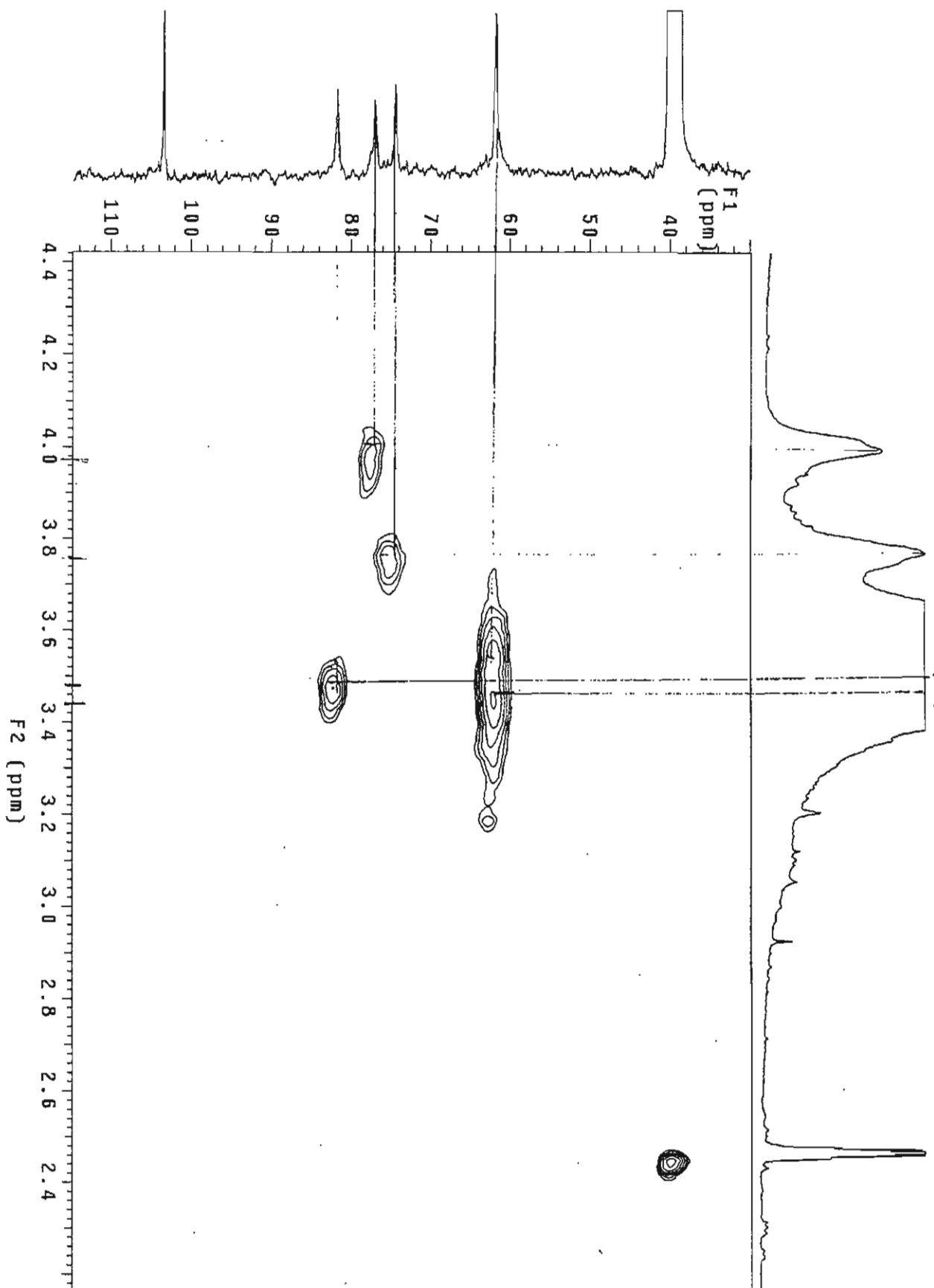


Figura 8. Espectro de HETCOR de la peltalosa

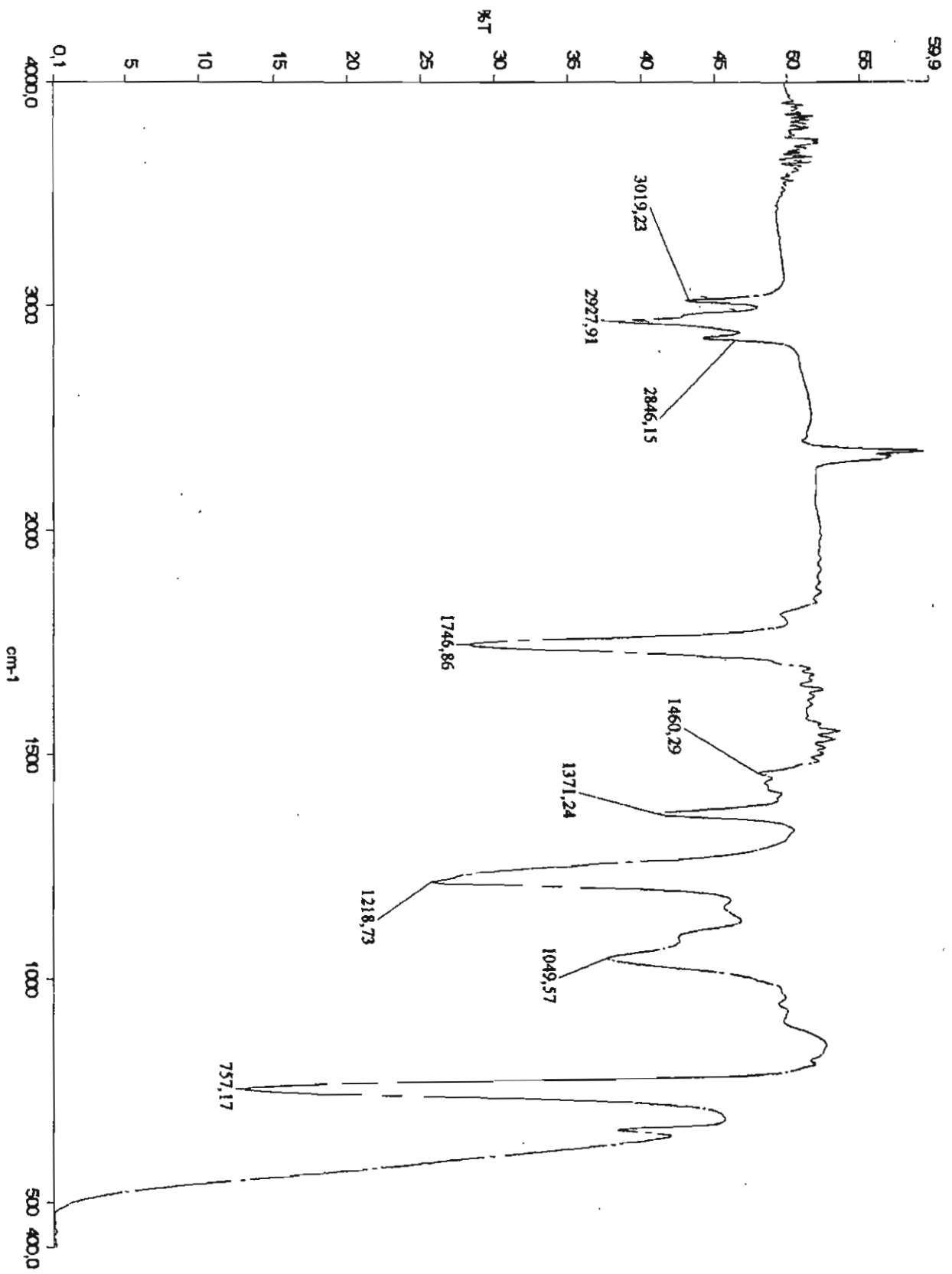


Figura 9. Espectro de IR del Acetato de la Peltandra

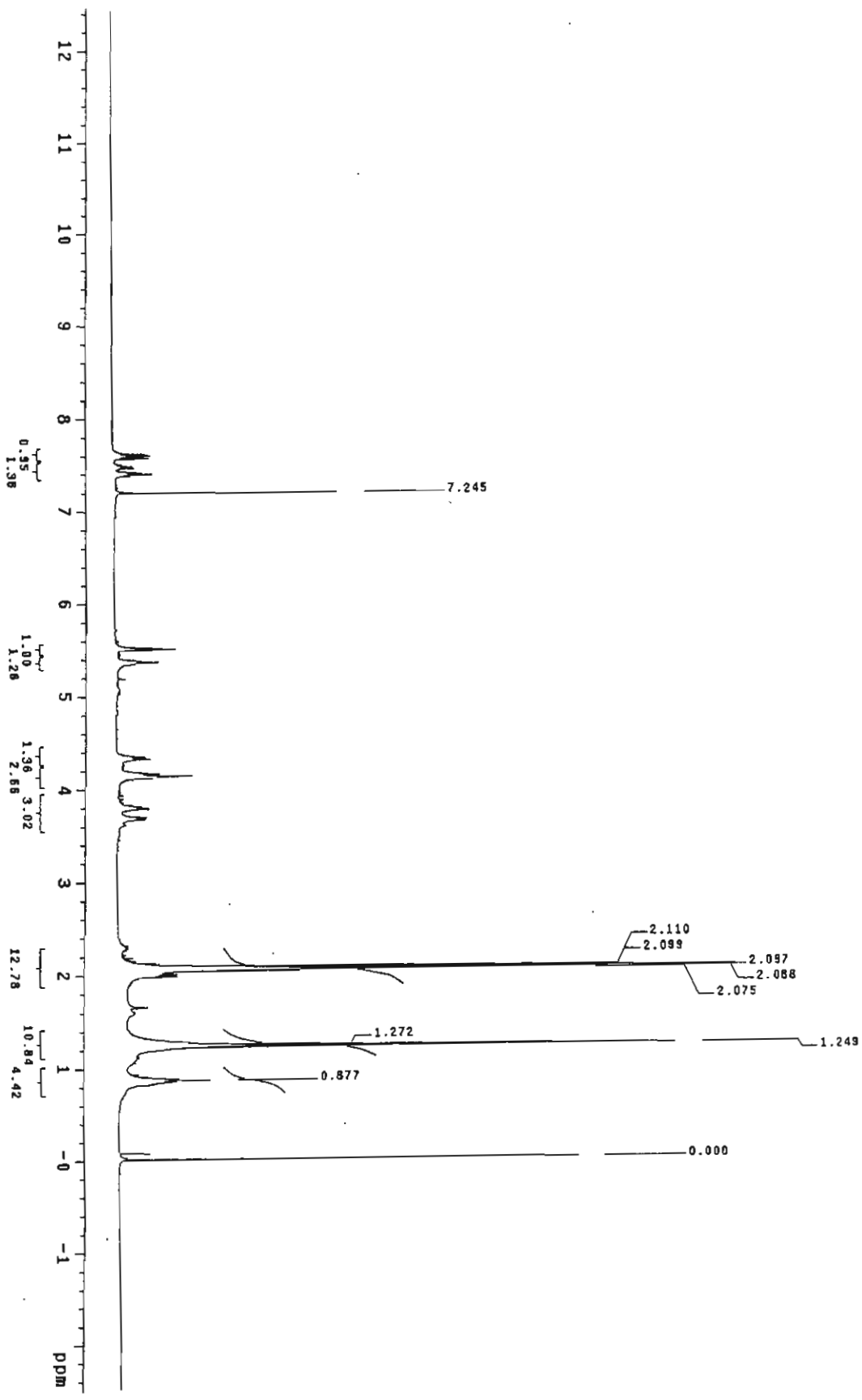
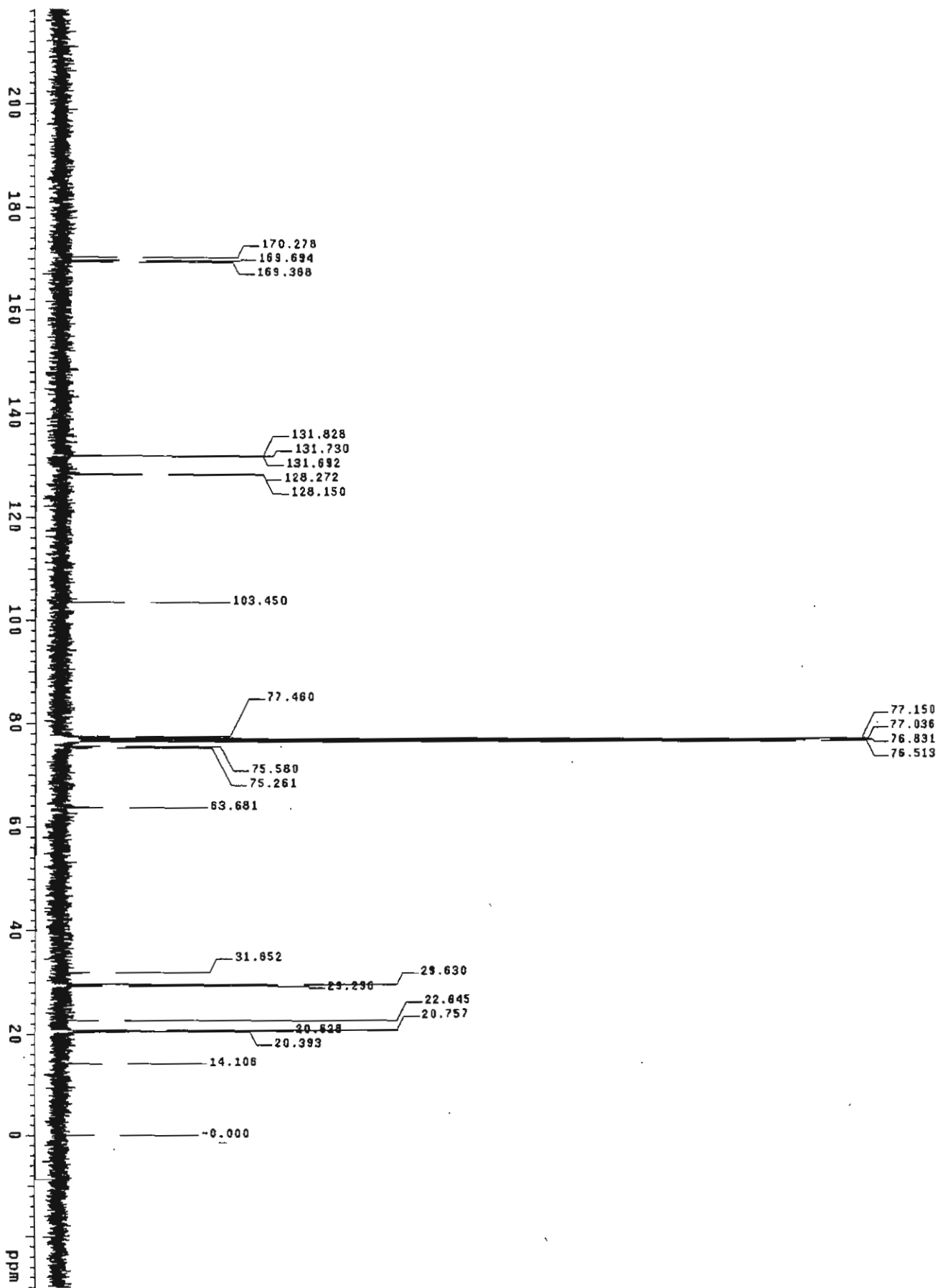


Figura 10. Espectro de ¹H RMN del Acetato de Petalosa

Figura 11. Espectro de ^{13}C RMN del Acetato de Peltalosa



Anti-Hyperglycemic Effect of *Psacalium peltatum*

CLAUDIA CONTRERAS-WEBER¹, SALUD PEREZ-GUTIERREZ²,
FRANCISCO ALARCON-AGUILAR³ & RUBEN ROMAN-RAMOS^{3*}

¹Doctorado en Ciencias Biológicas UAM-Iztapalapa; ²Departamento de Sistemas Biológicos UAM-Xochimilco; ³Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Apdo. Postal 55-535, México, D.F. 09340

*e-mail: rroman@data.net.mx

Diabetes mellitus is a metabolic disease with a high incidence (4-5%) all over the world [1]. In spite of the introduction of hypoglycemic agents, diabetes and related complications continue to be a major medical problem.

Though different types of oral hypoglycemic agents are available along with insulin for the treatment of diabetes mellitus, there is a growing interest in herbal remedies, due to the side effects associated with current therapeutic agents [2,3]. In recent years, various plant extracts have been claimed to be useful for the therapy of diabetic hyperglycemia and have been widely investigated [4-20].

In Mexico, plants have long been used for the empirical treatment of diabetes. In fact, world ethnobotanical information about medicinal plants reports almost 800 plants used in the control of diabetes mellitus, although only a few of them have been scientifically studied [21].

One of the most important of these is *Psacalium peltatum* (Compositae), a herbaceous plant popularly known as "matarique". The roots are the primary part used for treatment of diabetes mellitus. To date, the supposed antidiabetic properties of this plant have been poorly studied. The present investigation was undertaken to study the anti-hyperglycemic effect of an aqueous decoction of *P. peltatum* (matarique) in normoglycemic and diabetic mice; to study the extracts organic and aqueous obtained from *P. peltatum* in healthy mice; and to start the isolation and the chemical purification of any antihypoglycemic principle of the plant.

METHODS:

Plant material. *Psacalium peltatum* was acquired from the Sonora Herbal Market at Mexico City. The identification was made with the help of an expert in botany using taxonomic rules and by means of comparisons among different herbarium samples of *P. peltatum* from MEXU-HERBARIUM (Herbarium IMSSM-Voucher Specimen 11490).

Hypoglycemic effect of traditional preparation of *Psacalium peltatum*. The plant was prepared in the same way as described previously for *P. peltatum* [6]. The dried roots (40 g) were put in boiling water (300 mL) for 10 min and left to cool at room temperature. The decoction was then filtered and directly administered to the experimental animals (4 ml/kg weight). A similar prepared decoction is the common form of administration used in popular medicine.

Isolation of compounds from the roots of *Psacalium peltatum*. *Psacalium peltatum* roots (3000 g) were grounded and extracted one time with hexane (3 L, 4 h). The extract was concentrated under reduced pressure and pooled, giving 163.2 g of material (yield 5.44%). The plant resi-

due was then extracted one time with chloroform (3 L, 4 h). This extract was concentrated under reduced pressure and pooled, giving 81.6 g residue (yield 2.72%). The plant residue was then extracted one time with methanol (3 L, 4 h). The methanol extract were concentrated under reduced pressure and pooled, giving 215.4 g of material (yield 7.18%). Finally, the marc was extracted one time with water (2.5 L, 4 h). The water was freeze-dried, yielding 250.4 g of residue (8.34%). Part of methanol extract (200 g) was subjected to column chromatography with silica, eluting sequentially with hexane, 90:10 hexane:methanol, 80:20 hexane:methanol, etc., ending with methanol. Seven fractions were obtained, and bioassayed. Hypoglycemic activity was detected in Fraction VII. This fraction was further fractionated on silica, eluting sequentially with ethylacetate, 90:10 ethylacetate:methanol, 80:20 ethylacetate:methanol, etc., ending with methanol. This yielded 7 subfractions. Hypoglycemic activity was present in subfractions II and III.

Experimental animals. Male adult mice (CD1 strain) were used, weighing from 20 to 30 g, fed with Purina nutrition and water *ad libitum*. Prior to each study, the animals were subjected to fasting for 18 h.

Induction of experimental diabetes. Mice were fasted for 18 h. and experimental diabetes was then induced by three ip administrations of alloxan (150 mg/kg body weight) at intervals of 48 h [22]. Seven days after the last administration, the animals were fasted for 18 h and blood glucose levels were determined. These animals were included in two experimental groups: (i) mildly alloxan-diabetic mice, whose basal glycemia ranged between 200 to 349 mg/dl; and (ii) severely alloxan-diabetic mice, whose basal glycemia was equal or higher than 350 mg/dl.

Biological assays.

(i) Hypoglycemic activity of the traditional preparation obtained from *Psacalium peltatum* roots on fasting blood glucose levels in healthy, mild diabetic and severe diabetic mice: Healthy, mildly diabetic and severely diabetic mice were subdivided into two groups of 10 animals each (I-II). Groups I served as control and received isotonic saline solution (ISS). Group II received 4 ml/kg body weight of the water decoction (traditional preparation).

(ii) Hypoglycemic activity of extracts from *Psacalium peltatum* roots on fasting-blood glucose levels in healthy mice: Healthy mice were divided into six groups of 10 animals each (III-VIII). Group III and IV served as controls and received ISS or corn oil (4 ml/kg body weight). The other four groups received 100 mg/kg body weight of each extract. Organic extracts (hexane and chloroform) were dissolved in corn oil, and methanol and water extracts in ISS.

(iii) Hypoglycemic activity of fractions from *P. peltatum* roots on fasting-blood glucose levels in healthy mice: Healthy mice were divided into nine groups of 8 animals each (IX-XVII). Group IX and XIII served as control and received corn oil and ISS, respectively (4 ml/kg body weight). Groups X, XI, XII, XIV, XVI, XVII received 100 mg/kg body weight of each fraction. FI, FII and FIII were dissolved in corn oil; FIV, FV, FVI, FVII, were dissolved in ISS.

(iv) Hypoglycemic activity of subfractions from *P. peltatum* roots on fasting-blood glucose levels in healthy mice: Healthy mice were divided into eight groups of 8 animals each (XVIII-XXV). Group XVIII served as

and received ISS (4 ml/kg body weight). All groups received 100 mg/kg body weight of each subfraction, dissolved in ISS.

In all cases the control substances, extracts, fractions and subfractions were injected ip. Blood samples were obtained from the tail vein in fasting animals (t=0), and 120 and 240 min after administration of the test substance. Glycemia was determined by the glucose-oxidase peroxidase method with Accurend Sensor Confort Glucose Strips (Roche).

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. The significance of the differences between the means of tests and control studies was established by Student's *t*-test for independent samples with one tail. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Table 1. Effect of *P. peltatum* root water decoction on fasting blood glucose levels of healthy mice

Study	Blood Glucose (mg/dL)		
	t = 0 min	t = 120 min	t = 240 min
Control (ISS)	47.7 \pm 2.8	48.4 \pm 2.1	45.8 \pm 2.9
<i>P. peltatum</i>	49.1 \pm 2.1	47.7 \pm 2.0	37.4 \pm 2.0 **

Data are means \pm SEM for a sample of 10. Significantly different from its prevalence in fasting: **p* < 0.05, ***p* < 0.005

Table 2. Effect of *P. peltatum* root water decoction on fasting blood glucose levels of mild-diabetic mice

Study	Blood Glucose (mg/dL)		
	t = 0 min	t = 120 min	t = 240 min
Control (SSI)	276.8 \pm 5.4	232.0 \pm 7.7	206.1 \pm 10.1
<i>P. peltatum</i>	198.7 \pm 3.7	161.9 \pm 6.3 **	62.5 \pm 5.5 **

Data are means \pm SEM for 10 animals. Significantly different from its prevalence in fasting: **p* < 0.01, ***p* < 0.005

Table 3. Effect of *P. peltatum* root water decoction on fasting blood glucose levels of diabetic mice

Study	Blood Glucose (mg/dL)		
	In fasting	t=120 min	t=240 min
Control (SSI)	421.2 \pm 2.3	405.6 \pm 3.7	369.6 \pm 7.8
<i>P. peltatum</i>	366.8 \pm 3.3	423.8 \pm 5.0	354.2 \pm 11.7

Data are means \pm SEM for 10 animals. No significant differences were found.

Table 4. Variation of the glycemia in healthy mice after ip administration of *P. peltatum* extracts

Study	Fasting blood sugar (mg/dL)	Blood Sugar (mg/dL)	
		t=120 min	t=240 min
Control (ISS)	53.4 \pm 4.0	45.1 \pm 2.8	34.6 \pm 6.7
Control(Corn oil)	56.0 \pm 5.1	46.3 \pm 4.7	40.0 \pm 2.9
Hexane	51.9 \pm 2.5	37.5 \pm 3.7	38.7 \pm 4.7
Chloroform	53.2 \pm 4.0	38.4 \pm 3.4	39.8 \pm 3.7
Methanol	54.9 \pm 4.0	33.0 \pm 5.3*	22.9 \pm 8.6*
Aqueous	56.3 \pm 2.7	25.0 \pm 3.9**	16.5 \pm 3.7**

Data are means \pm SEM for 10 animals. Significantly different from control: **p* < 0.005, ***p* < 0.001

RESULTS: A water decoction of *Psacalium peltatum* root (4 ml/kg body weight) caused a significant hypoglycemic effect in healthy (Table 1) and mildly alloxan diabetic mice (Table 2) with the most marked effect 240 min after administration (*p* < 0.005). In severely alloxan-diabetic mice, the decrease of blood glucose level was minor (Table 3), and not statistically significantly.

The extracts of hexane and chloroform obtained from *P. peltatum* roots, administered at dose of 100 mg/dl body weight, did not show significant hypoglycemic effects in healthy mice. However, the same dose of the methanolic and water extracts showed a significant hypoglycemic effect (*p* < 0.005 and *p* < 0.001; respectively). (Table 4).

Table 5. Variation of the glycemia in healthy mice after ip administration of the fractions obtained from the *P. peltatum* of the methanolic extract

Study	Fasting Blood Glucose g(dL)	Blood Glucose (mg/dL)	
		t = 120 min	t=240 min
Control(Corn oil)	67.4 \pm 2.5	72.0 \pm 5.3	58.4 \pm 2.7
FI	62.5 \pm 2.1	62.6 \pm 3.9	60.3 \pm 4.7
FII	65.6 \pm 2.9	63.1 \pm 3.2	55.8 \pm 2.2*
FIII	55.2 \pm 2.9	66.5 \pm 4.5	46.2 \pm 3.8*
Control (ISS)	61.5 \pm 3.4	64.7 \pm 4.5	63.0 \pm 2.4
FIV	65.3 \pm 3.0	46.1 \pm 5.7*	72.3 \pm 7.0
FV	67.3 \pm 3.3	56.8 \pm 5.0*	69.2 \pm 4.6
FVI	61.1 \pm 4.2	68.0 \pm 5.9	70.3 \pm 5.5
FVII	75.3 \pm 4.1	51.3 \pm 2.7**	55.7 \pm 2.8**

Data are means \pm SEM for 8 animals per group. Significantly different from its prevalence in fasting: **p* < 0.05, ***p* < 0.005

Table 6. Variation of glycemia during glucose tolerance in healthy mice with ip administration of the subfractions of the fraction FVII of the methanolic extract of *P. peltatum*

Study	Fasting Blood Sugar (mg/dL)	Blood Sugar (mg/dL)	
		t = 120 min	t = 240 min
Control (SSI)	61.1 \pm 1.9	59.5 \pm 4.1	55.4 \pm 4.0
SFI	46.0 \pm 2.6	50.1 \pm 3.2	49.1 \pm 5.8
SFII	65.1 \pm 4.8	55.2 \pm 2.7*	60.0 \pm 4.3
SFIII	66.8 \pm 3.8	56.8 \pm 2.4*	69.0 \pm 3.5
SFIV	52.3 \pm 2.3	54.8 \pm 4.1	57.2 \pm 4.8
SFV	65.0 \pm 4.0	64.4 \pm 4.3	63.4 \pm 3.8
SFVI	59.6 \pm 4.0	56.8 \pm 5.5	56.1 \pm 6.1
SFVII	60.0 \pm 2.3	68.7 \pm 6.1	63.6 \pm 5.9

Data are means \pm SEM for 8 animals per group. Significantly different from its prevalence in fasting: **p* < 0.05

The methanol extract was fractionated by column chromatography. The effects of the fractions on the fasting blood glucose levels of normal mice are shown in Table 5. Only FVII showed significant a hypoglycemic effect in healthy mice at 120 and 240 min (*p* < 0.005) after ip administration. This fraction FVII was fractionated further to yield seven

actions. From these, only subfractions SFII and SFIII significantly reduced blood glucose in healthy mice (Table 6).

DISCUSSION: The results of this investigation confirm the previously observed hypoglycemic effect of *P. peltatum* in healthy mice [23], and show that the water decoction exhibits the greatest hypoglycemic activity in mildly alloxan diabetic mice, with a minor hypoglycemic effect observed in markedly diabetic mice. These results suggest that the hypoglycemic activity of *P. peltatum* roots requires the presence of functioning beta cells. In addition, water and methanolic extracts of *P. peltatum* roots exhibit the highest hypoglycemic effect in healthy mice compared with hexane and chloroform extracts. As the methanolic extract yielded the best activity, it was submitted to a separation process by chromatographic column, and seven fractions were obtained. After each fraction was administered to healthy mice, it was possible to detect hypoglycemic activity in the fraction FVII. A second chromatographic separation was performed on this fraction, yielding seven subfractions. Of these seven, subfractions SFII and SFIII of this second chromatography significantly reduced blood glucose in healthy mice. By TLC it was found that these subfractions contain different compounds, and it is probable that the substance with hypoglycemic activity is located in one of them.

Finally, because the plants empirically used by the population as antidiabetic agents represent a potential alternative for diabetic control, especially in the third world, it is necessary to remark that pharmacological and chemical investigations of them must be continued.

SUMMARY: The purpose of this research was to study the anti-hyperglycemic effect of *Psacalium peltatum*, a folk medicinal plant used in treatment of diabetes mellitus. This plant was processed in the traditional way (water decoction) and administered ip to normoglycemic and diabetic mice. Hexane, chloroform, methanol and water extracts were administered to fasting healthy mice. The results showed that the water decoction, methanolic extract and aqueous extracts exhibit hypoglycemic activity in the studied mice. The methanolic extract was submitted to a separation process by chromatographic column from which seven fractions were obtained. Each fraction was administered to healthy mice

and hypoglycemic activity was found in fraction VII. A second chromatographic separation was performed on this fraction, to yield seven subfractions. The results of the biological trials showed that the subfractions SFII and SFIII significantly reduce blood glucose levels in healthy mice.

REFERENCES

1. Pickup JC, Williams G: Epidemiology of diabetes mellitus. In: Textbook of diabetes, 2nd Ed. Vols. I & 2, Blackwell, Oxford, pp 3.1-3.28 (1997).
2. Prout TE: Excerpta Medica, Amsterdam, p. 162 (1974).
3. Holman RR & Turner RC: Oral agents and insulin in the treatment of NIDDM. In: Pickup, J, Williams, G (Eds.), Text Book of Diabetes. Blackwell, Oxford, pp. 467-469 (1991).
4. Bailey CJ & Day C: Diabetes Care 12: 553-564 (1989).
5. Ivorra MD, Paya M & Villar A: J Ethnopharmacol 27: 243-275 (1989).
6. Roman Ramos R, Flores Saenz JL, Partida Hernandez G, Lara Lemus A & Alarcon Aguilar F: Archivos de Investigacion Medica 22: 87-93 (1991).
7. Roman Ramos R, Alarcon Aguilar F, Lara Lemus A & Flores Saenz JL: Archives Med Res 23: 59-64 (1992).
8. Neef H, Declercq P & Laekeman G: Phytotherapy Res 9: 45-48 (1995).
9. Roman Ramos R, Flores Saenz JL & Alarcon Aguilar F: J Ethnopharmacol 48: 25-32 (1995).
10. Ernst E: Phytomedicine 4: 73-78 (1997).
11. Gray AM & Flatt PR: Brit J Nutr 78: 325-334 (1997).
12. Hersch-Martinez P: Econ Bot 51: 107-120. (1997).
13. Pinto A, Capasso A & Sorrentino L: Drug Res 47: 829-833 (1997).
14. Qubre AY, Carlson TJ, King SR & Reaven GM: Diabetologia 40: 614-617 (1997).
15. Alarcon Aguilar FJ, Roman Ramos R, Perez Gutierrez MS, Aguilar Contreras A, Contreras Weber CC & Flores Saenz JL: J Ethnopharmacol 61: 101-110 (1998).
16. Al-Habori M & Raman A: Phytotherapy Res 12: 233-242 (1998).
17. Perez GRM, Zavala SMA, Perez GS & Perez GC: Phytomedicine 5: 55-75 (1998).
18. Aderbighe AO, Emudianughe TS & Lawal BA: Phytotherapy Res 13: 504-507 (1998).
19. Gray AM & Flatt PR: Brit J Nutr 81: 203-209 (1999).
20. Alarcon Aguilar FJ, Jimenez Estrada M, Reyes Chilpa R, Gonzalez Paredes B, Contreras Weber CC & Roman Ramos R: J Ethnopharmacol 69: 207-215 (2000).
21. Alarcon Aguilar FJ, Roman Ramos R & Flores Saenz JF: Ciencia 44: 368-381 (1993).
22. Rodriguez H, Perez RM, Muñoz H, Perez C & Miranda R: Acta Medica XI: 33-36 (1975).
23. Alarcon Aguilar FJ, Roman Ramos R, Jimenez Estrada M, Reyes Chilpa R, Gonzalez Paredes B & Flores Saenz JL: J Ethnopharmacol 55: 171-177(1997).