



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del Efecto Hipoglucemiante del Extracto
Etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule* (Gordolobo), en
un Modelo de Ratones CD1.**

T E S I S

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

PRESENTA:

ORTIZ ARVEA ARIADNA JUDITH

DIRECTOR DE TESIS: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR DE TESIS: DR. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

Lugar de desarrollo:

LABORATORIO 1 PLANTA ALTA-UMIEZ, FES Zaragoza-Campus II.

AGRADECIMIENTO AL PROYECTO PAPIME PE203613

MÉXICO, D.F. 2013.



**FES
ZARAGOZA**

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme culminar con este gran logro.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por ser mi segunda casa, de la cual siempre estaré orgullosa de haber pertenecido a ella.

A mi familia:

Por ser el soporte más sólido que tuve durante la carrera. Por ser lo más hermoso que tengo. Por la unión y amor que siempre ha existido. A mis padres, a mi hermano por su apoyo. A mis tíos y tías por su confianza. A mi tía Alba por haber sido parte importante en mi formación. A mi abuelita Graciela por su cariño, a mis primos con los que he convivido siempre. A todos ellos gracias.

A mi director de tesis:

El Dr. Rubén Marroquín Segura, por brindarme el apoyo para la realización de este trabajo, por su dedicación con los alumnos, por su comprensión, por su buen humor y sobre todo por compartir conmigo sus conocimientos académicos y de la vida en general. Sin duda es un ejemplo a seguir.

A mis profesores:

A mi asesor de tesis el Dr. José Luis A. Mora Guevara por apoyarme con sus conocimientos durante la realización de este proyecto.

A mi revisora de tesis la M.C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara por su paciencia y objetividad.

A mis sinodales el M.C. Maurilio Flores Pimentel y la M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez por su amabilidad y su confianza para conmigo.

A los profesores Yolanda, Ricardo y Armando por hacer de mi estancia en el laboratorio fuera provechosa y agradable.

A todos ellos un especial agradecimiento por haberme impartido clases en algún momento de la carrera y ser parte de mi formación académica.

A mis amigos:

A todos ellos por haber sido parte importante en algún momento de mi vida académica, durante la carrera y durante la realización de esta tesis. Y aunque habremos o no de tomar rumbos distintos, siempre estarán presentes.

A Elvia, Maggie, Michel, por compartir tan buenos momentos. A Miguel por haberse convertido en uno de los mejores amigos que espero mantener a mi lado por mucho tiempo más.

A Misael por haberme impulsado a seguir adelante durante toda la carrera y por su apoyo incondicional.

A todos los compañeros del Laboratorio 1-Planta alta de la UMIEZ por su buena vibra durante mi estancia en ella.

DEDICATORIAS

A mis padres Eduardo y Martha, por ser mi motivo de superación, por amarme, comprenderme y apoyarme incondicionalmente.

A mi padre por ser mi guía y mi apoyo, por su esfuerzo y sacrificio a pesar de las dificultades.

A mi madre por su dedicación y confianza, por su entereza. por su mano firme y sabia.

A mi hermano Eduardo por ser sinónimo de alegría en mi vida, desde el día en que nació, y por qué sé que algún día él será motivo de orgullo, satisfacción y admiración.

A mi María José.

"El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad."

Víctor Hugo

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
I. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 PLANTAS MEDICINALES.....	4
1.1.1 Importancia del estudio de las plantas medicinales.....	5
1.2 FAMILIA <i>ASTERACEAE</i>	6
1.2.1 <i>Gnaphalium semiamplexicaule</i> . D.C. (Gordolobo).....	7
1.2.1.1 Descripción.....	6
1.2.1.2 Información taxonómica.....	7
1.2.1.3 Usos del gordolobo.....	8
1.2.1.4 Estudios experimentales del gordolobo.....	8
1.2.1.5 Componentes del gordolobo.....	8
1.3 MODELO DE EXPERIMENTACIÓN.....	9
1.4 ESTUDIOS DE TOXICIDAD.....	11
1.4.1 Prueba de Toxicidad Aguda.....	11
1.4.2 Prueba de Toxicidad Subaguda.....	12
1.4.3 Prueba de Toxicidad Subcrónica.....	12
1.4.4 Prueba de Toxicidad Crónica.....	12
1.5 PÁNCREAS.....	13
1.6 INSULINA.....	15
1.6.1 Síntesis y metabolismo.....	15
1.6.2 Secreción.....	16
1.6.3 Mecanismo de acción.....	17
1.7 DIABETES MELLITUS.....	18
1.7.1 Definición.....	18
1.7.2 Clasificación.....	19
1.7.3 Epidemiología.....	21
1.7.4 Enfoque terapéutico.....	22
1.7.5 Fisiopatología.....	23
1.7.6 Fisiopatología de la Diabetes mellitus tipo 2.....	24

1.7.7 Manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2.....	25
1.7.8 Complicaciones.....	25
1.8 TRATAMIENTO.....	26
1.8.1 Agentes Hipoglucemiantes orales.....	26
1.8.1.1 Sulfonilureas.....	25
1.8.1.1.1 Glibenclamida.....	27
1.8.1.1.2 Tolbutamida.....	37
1.8.1.2 Biguanidas.....	28
1.8.1.2.1 Metformina.....	28
1.8.1.3 Inhibidores de la glucosidasa α	28
1.8.1.4 Tiazolidinedionas.....	29
1.9 BAZO.....	31
1.9.1 Electroforesis en acetato de celulosa para determinar proteínas séricas.....	31
1.10 HÍGADO.....	33
1.10.1 Marcadores enzimáticos TGP Y TGO.....	35
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
III. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo general.....	39
3.1.2 Objetivos específicos.....	39
IV. HIPÓTESIS.....	40
V. MATERIAL.....	41
VI. MÉTODOS.....	43
6.1 Elaboración del extracto y concentrado etanólico.....	45
6.2 Preparación de reactivos.....	45
6.3 Actividad hipoglucemiante. Ensayo biológico.....	46
6.4 Modelo de toxicidad subagudo.....	48
6.5 Pruebas serológicas.....	49
6.5.1 Electroforesis en acetato de celulosa para determinar proteínas séricas.....	49
6.5.2 Determinación de marcadores enzimáticos TGP Y TGO.....	50
VII. RESULTADOS.....	51
7.1 ENSAYO HIPOGLUCEMIANTE.....	51
7.2 ENSAYO DE TOXICIDAD SUBAGUDA.....	54

7.2.1 Electroforesis de proteínas séricas	55
7.2.2 Enzimas hepáticas.....	58
XI. DISCUSIÓN	59
X. CONCLUSIÓN	63
XI. PROPUESTA	64
XII. ANEXOS	65
XIII.REFERENCIAS	71

RESUMEN

Introducción. Las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. La verificación de los datos de medicina tradicional incluye bioensayos y caracterización de principios activos. Las enfermedades crónicas se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento. En este estudio se evaluó la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico de la planta medicinal conocida como gordolobo (*Gnaphalium semiamplexicaule*), misma que es utilizada empíricamente por la sociedad mexicana como agente hipoglucemiante.

Objetivo. Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Gnaphalium semimplexicaule* (Gordolobo), en un modelo de ratones CD1 hiperglucémicos.

Material y métodos. La planta fue autenticada en el herbario de la FES Zaragoza (FEZA)-UNAM se le asignó el número FEZA 13450. Se realizó una extracción con etanol, en un rotovapor. En el ensayo hipoglucemiante se utilizaron 6 grupos de 6 ratones con un peso promedio de 40 g. Se siguió un esquema de inducción de hiperglucemia con la aplicación subcutánea de glucosa al inicio del ensayo y a los 60 minutos. Al inicio del ensayo los animales recibieron por sonda gástrica: solución salina para el grupo control negativo, dosis del extracto de 25, 50 y 100 mg/kg para los grupos experimentales, glibenclamida y tolbutamida para los grupos positivos. Se midió la glucemia en intervalos de 60 minutos por 5 horas. Las muestras de sangre se obtuvieron por incisión en la parte distal de la cola. Para evaluar el posible efecto tóxico, en el ensayo de toxicidad aguda se usaron 24 ratones machos de 35 g formando 4 grupos de 6 animales. Los grupos tratados recibieron una dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg del extracto, mediante sonda gástrica, el control negativo solo recibió solución salina. Los animales se observaron diariamente durante 14 días. Al final del ensayo se obtuvo los sueros y se extrajeron los riñones, bazo, hígado y corazón y se calculó el peso relativo. En los sueros se determinó TGP/ TGO y electroforesis de proteínas séricas, debido a que los animales tratados mostraron hepatomegalia y con esplenomegalia

Resultados. Se observó actividad hipoglucemiante a una a la dosis de 100 mg/kg del extracto al tiempo 2. No se observaron muertes ni signos de intoxicación visibles, en los animales tratados. El grupo tratado con dosis de 25 mg/kg presentó hepatomegalia y se encontraron diferencias significativas a una $P < 0.05$ entre las medias de las enzimas transaminasa glutámico piruvica (TGP o ALT) contra las diferentes concentraciones del extracto y el testigo negativo. Los animales tratados con dosis de 100 mg/kg mostraron una esplenomegalia, en comparación al grupo testigo, no se mostró diferencia significativa en los patrones electroforéticos entre los grupos.

Conclusiones. Las diferencias estadísticas significativas encontradas en el ensayo demuestran que el extracto etanólico de *Gnaphalium semimplexicaule* "Gordolobo", a una dosis de 100 mg/kg tiene actividad hipoglucemiante así como efecto en bazo en el modelo usado; pero con los marcadores biológicos ensayados no encontramos diferencias significativas entre los grupos. A nivel hepático se sugiere una posible alteración celular hepática a una dosis de 25 mg/kg

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. Una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contenga en uno de sus órganos, o en toda la planta, los principios activos con actividad farmacológica que se puedan utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por hemisíntesis.

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana. Soportada por aproximadamente 4 500 especies, ésta ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas. La verificación entonces, de los datos de medicina tradicional incluye bioensayos y caracterización de principios activos. En México, de un aproximado de 4,000 especies medicinales, escasamente 250 están validadas farmacológica y clínicamente.

En este sentido es importante la detección e identificación de los principios activos ya que permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a las plantas, admite detectar posibles nuevas aplicaciones así como facilitar el descubrimiento de nuevos productos medicinales. Un ejemplo claro fue el desarrollo de investigaciones de los efectos de la planta medicinal *Galega officinalis* lo que condujo al descubrimiento y síntesis de metformina, un hipoglucemiante utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus.

En este contexto, las enfermedades crónicas se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento y de la prevención de las complicaciones. La diabetes mellitus representa una de las enfermedades de mayor proporción dentro de los padecimientos crónicos degenerativos.

Los cambios en el comportamiento humano y los estilos de vida en el último siglo han provocado un gran incremento de la incidencia mundial de diabetes, sobre todo de tipo 2. Los efectos de esta enfermedad se magnifican al afectar con mayor frecuencia a grupos de población cuyos factores sociales o económicos limitan su acceso al tratamiento.

En este estudio se evaluará el extracto etanólico de la planta medicinal conocida como gordolobo (*Gnaphalium semiamplexicaule*), misma que es utilizada empíricamente por la sociedad mexicana, entre otras cosas como agente hipoglucemiante en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2.

I. MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS MEDICINALES

La herbolaria, cómo se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales en nuestro país continua vigente. Las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana. En este contexto la Organización Mundial para la Salud reconoce el valor de esta práctica terapéutica, definiendo la medicina tradicional como prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades.¹

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

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

En la actualidad, debido a la estructura económica y social que ha adoptado nuestro país, las nuevas generaciones menosprecian o ignoran este legado cultural, por lo que se considera que si no hay un cambio de actitud se perderá irremediabilmente en corto

plazo. Por otra parte, muchas de las plantas medicinales utilizadas cotidianamente, son objeto de sobrecolecta, disminuyendo sus poblaciones y las posibilidades potenciales de conservación y aprovechamiento. ⁴

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana. Soportada por aproximadamente 4 500 especies, ésta ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas.⁵

1.1.1 Importancia del estudio de las plantas medicinales

El estudio de las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en la farmacología. La Fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a la plantas.

Es importante la detección e identificación de los principios activos ya que permite corroborar o rechazar las propiedades atribuidas a las plantas, admite detectar posibles nuevas aplicaciones así como facilitar el descubrimiento de nuevos productos medicinales.

La verificación de los datos de medicina tradicional incluye bioensayos y caracterización de principios activos. En México, de un aproximado de 4,000 especies medicinales, escasamente 250 están validadas farmacológica y clínicamente.⁶

El estudio de hipoglucemiantes naturales por ejemplo, puede llevar al desarrollo de fármacos con utilidad terapéutica con potencial para el tratamiento de la diabetes mellitus

(DM). Entre los compuestos químicos aislados de plantas con actividad biológica para el tratamiento de la DM documentada son: alcaloides, glucósidos, polisacáridos, guanidinas, glicopéptidos, terpenoides y aminoácidos. Así, las investigaciones de los efectos de la planta medicinal *Galega officinalis* condujo al descubrimiento y síntesis de metformina.⁷

1.2 FAMILIA ASTERACEAE

La familia *Asteraceae* ocupa un lugar preponderante en la flora de México, tanto a nivel de géneros como de especies y contribuye substancialmente a la enorme riqueza florística de nuestro país. Con base en una revisión exhaustiva de la literatura taxonómica y florística y en la consulta de varios herbarios, se estima que *Asteraceae* es la más grande familia de la flora mexicana, lo que representa el 12,5% de todos los géneros en la todo el país. Existen entidades federativas que carecen todavía de inventarios florísticos y en consecuencia de un recuento actualizado del número de especies de *Asteraceae* que contienen.⁸

De la flora nacional, la familia *Asteraceae* es una de las más estudiadas; sin embargo aún se tiene insuficiente conocimiento de ella a nivel regional o estatal. Esta especie se encuentra dentro de las 7 familias más utilizadas como agentes hipoglucemiantes, de las 93 que existen en México.⁹

1.2.1 *Gnaphalium semiamplexicaule*. D.C. (Gordolobo)

1.2.1.1 Descripción

Es conocido comúnmente como gordolobo, cómo se muestra en la figura 1 y 2 es una hierba de 40 cm a 1.5 m de altura con los tallos aterciopelados de color blanquecino. Las hojas son más largas que anchas pero pequeñas, un poco velludas. Las flores son amarillentas o blanquecinas y están reunidas en cabezuelas, se ven plateadas con la luz del sol. Es originario de México, habita en clima templado entre los 2000 y los 3000 msnm. Asociada a vegetación perturbada de pastizal, bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino.



Figura 1 y 2.- Gordolobo
(*Gnaphalium semiamplexicaule*)

1.2.1.2 Información taxonómica

Reino:	<i>Plantae</i>
Phylum:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Gnaphalium</i>
Epíteto específico:	<i>semiamplexicaule</i>
Nombre Científico:	<i>Gnaphalium semiamplexicaule</i> DC. ¹⁰

1.2.1.3 Usos del Gordolobo

Las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente a esta planta se relacionan con la cura de padecimientos respiratorios: como bronquitis, asma e irritación de la garganta; pero el uso más frecuente que se registra, es contra la tos. Se utiliza como tónico, como remedio para la bilis y para calmar los nervios; para el dolor de estómago y cólicos. En el tratamiento de estos padecimientos se emplea la parte aérea preparada en cocimiento y administrada por vía oral. Asimismo se le ocupa para lavar heridas y pústulas; y para estimular la circulación sanguínea, en várices y hemorroides. También se reporta su utilización como hipoglucemiante en algunas regiones de la república mexicana.⁹ Estas aplicaciones terapéuticas más frecuentes no se han validado experimentalmente.

En la flora de Durango y zonas adyacentes existen por lo menos once especies de *Gnaphalium sp*, mismas que son utilizadas tradicionalmente como medicinales⁶, sin embargo es vendido simplemente como Gordolobo, lo que no permite definir exactamente la especie y la actividad para cada una.

1.2.1.4 Estudios experimentales del Gordolobo

La infusión obtenida de las flores ejerció un efecto relajante en músculo liso de íleon, y estimulante en útero de perro a la dosis de 1g /10ml de agua por animal. Esta infusión provocó una acción hipoglucémica en el mismo animal, cuando se administró por vía intravenosa.¹¹

1.2.1.6 Componentes del gordolobo

Contienen terpenos, flavonoides, glucósidos y compuestos poliacetilénicos.⁴

1.3 MODELO DE EXPERIMENTACIÓN

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos. La NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, define a un animal de laboratorio como el animal utilizado en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza.¹²



Figura 3. Ratón CD 1

La selección de la especie animal se realiza atendiendo a criterios de disponibilidad, sensibilidad y similitud. En relación con la disponibilidad o conveniencia, en general se utilizan animales pequeños por razones económicas que condicionan la infraestructura, consumo de alimentos, gasto de producto y eliminación de residuos. La comodidad de manejo, reproducción y suministro hacen que los más empleados sean rata, ratón, conejo, cobayo, hámster y perro. Los roedores tienen un periodo de gestación corto, una alta tasa de fertilización y amplias camadas, por lo que es barato producir grandes cantidades para la investigación, a la vez que son muy útiles para estudiar el potencial reproductivo y la toxicidad sobre el desarrollo. Las ratas y ratones presentan una alta velocidad metabólica, pueden ser sensibles al estrés.

De las cepas empleadas del ratón, el CD1 es más utilizado debido a que es una cepa definida genéticamente, de reproducción rápida y comportamiento conocido. Algunas características de las diferentes cepas de ratón, se muestran en la siguiente tabla:

Ratón:	
CD-1:	<ul style="list-style-type: none">— Albina, no consanguínea, muy empleada.— Propensa a neoplasias hepáticas y amiloidosis.
C3H:	<ul style="list-style-type: none">— Consanguínea, muy empleada.— Propensa a neoplasias hepáticas.
C57BL:	<ul style="list-style-type: none">— Negra y consanguínea.
BALB/c:	<ul style="list-style-type: none">— Albina, consanguínea.— Propensa a atrofia testicular.

Tabla 1. Características de cepas más empleadas del ratón.

1.4 ESTUDIOS DE TOXICIDAD

El tamizaje farmacológico constituye una de las etapas iniciales en la investigación sobre plantas medicinales, implementando un conjunto de técnicas relativamente simples que permiten evaluar la posible acción farmacológica y la toxicidad de una planta. Los modelos de estudio de toxicidad en animales, son protocolos bien definidos diseñados para proveer una descripción de los efectos producidos por un compuesto, si estos datos son propiamente calificados, llegan a ser aplicables a modelos humanos. Hay que tener en cuenta que los estudios de toxicidad no están diseñados para demostrar que una sustancia, principio activo o fármaco es seguro para la salud, sino para encontrar los posibles efectos tóxicos que este pueda generar. Los estudios toxicológicos ofrecen información sobre la dosis a partir de las cuales los efectos tóxicos comienzan a aparecer. Es imprescindible establecer los efectos tóxicos de una sustancia, principio activo o fármaco y para ello se realizan estudios de toxicidad aguda, subaguda, crónica y subcrónica sobre animales de experimentación.²

1.4.1 Prueba de Toxicidad Aguda

Generalmente es la primera prueba de toxicidad que se le hace a una sustancia, fármaco o principio activo, y se determina con una sola administración en un organismo, los objetivos de este estudio son proveer un estimado de la toxicidad específica de la sustancia, muchas veces es expresado como dosis letal aproximada (LD50), también provee información de los órganos afectados y otras manifestaciones clínicas de toxicidad, identificar las diferentes especies que son susceptibles, así como proveer información para poder diseñar y escoger la dosis en un estudio subcrónico.

1.4.2 Prueba de Toxicidad Subaguda

Ésta prueba está diseñada para obtener información de la toxicidad de una sustancia, fármaco o principio activo, después de haber repetido la dosis, sirviendo para establecer la dosis en el estudio subcrónico, los protocolos tradicionalmente manejan diferentes dosis de los químicos en 14 días de exposición.

1.4.3 Prueba de Toxicidad Subcrónica

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

1.4.4 Prueba de Toxicidad Crónica

Es un estudio diseñado de similar forma a la exposición subcrónica, la diferencia radica en que el estudio se prolonga de 6 meses hasta 2 años, si el estudio lo requiere, la selección de la dosis es crítica en este tipo de estudios ya que se puede llegar a provocar la muerte prematura del animal con una dosis alta. La toxicidad crónica puede llegar a incluir caracterización carcinogénica del compuesto.

La verdadera finalidad del estudio es encontrar toxicidad progresiva debido a que la sustancia toxica se acumula dentro del animal.

1.5 PÁNCREAS

El páncreas es una glándula que está situada detrás de la parte inferior del estómago y está innervado por el sistema nervioso autónomo. Éste tiene funciones endocrinas y exocrinas. El páncreas exocrino contiene acinos, que secretan el jugo pancreático que contiene enzimas digestivas y líquidos alcalinos hacia el duodeno por medio de los conductos pancreáticos. El páncreas endocrino secreta hormonas como la insulina y el glucagon; está compuesto por cúmulos de células llamados Islotes de Langerhans que se distribuyen en todo el páncreas exocrino. Están dispersos en el parénquima pancreático, aunque abundan en la cola más que en el cuerpo y la cabeza de dicha glándula. Los islotes beta comprenden aproximadamente 2% del volumen de la glándula, en tanto la porción exocrina de la misma compone el 80%, y el resto está integrado por conductos y vasos sanguíneos.¹³

Estos islotes contienen tres tipos principales de células secretoras de hormonas:

- Las células α : secreta el glucagon, que moviliza el glucógeno del hígado y suprime la secreción de insulina; el glucagon es crucial para mantener la concentración normal de glucosa sanguínea entre las comidas.
- Las células β : secretan insulina, que induce la utilización y almacenamiento de glucosa.

-
-
- Las células δ : secretan somatostatina y gastrina, que regulan la función de las células α y β mediante la supresión de la liberación de insulina, glucagon y polipéptidos pancreáticos.

Las hormonas secretadas por los islotes pancreáticos son elementos de control importantes del metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. La secreción de insulina aumenta cuando se incrementan:

- La glucemia
- Aminoácidos
- Potasio, fosfato y magnesio
- Glucagon y gastrina

La energía en forma de glucosa es esencial para el funcionamiento humano óptimo. La glucosa es un monosacárido derivado de los carbohidratos de la dieta. El exceso de glucosa se almacena como glucógeno en el hígado. La glucosa sanguínea induce la liberación de insulina. La insulina es una hormona anabólica necesaria para la captación de glucosa por parte de muchas células, en especial las del hígado, músculo y tejido adiposo. No es necesaria para la captación de glucosa en cerebro, eritrocitos, riñones y cristalino del ojo.¹⁴

La insulina desempeña una función anabólica e incrementa el almacenamiento de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos. El glucagon tiene una función catabólica, pues moviliza los tres nutrientes (carbohidratos, proteínas y grasas) y los hace pasar a la corriente sanguínea.

El exceso de insulina causa hipoglucemia, que puede generar crisis convulsivas y coma. La deficiencia de la misma hormona, absoluta o relativa, ocasiona diabetes mellitus (aumento de la glucemia por largo tiempo) enfermedad compleja y debilitante que puede culminar en la muerte si no es tratada. La deficiencia de glucagon puede originar hipoglucemia y el exceso de esta hormona empeora la diabetes. La producción excesiva de somatostatina por el páncreas origina hiperglucemia y más manifestaciones de la diabetes.¹²

1.6 INSULINA

La insulina es una proteína compuesta por dos cadenas peptídicas (cadena A y cadena B) que se conectan por dos enlaces disulfuro. Tiene un peso molecular de 5700 daltones. De una especie a otra, se detectan diferencias pequeñas en la composición de aminoácidos de su molécula; ellas casi nunca bastan para alterar o disminuir la actividad biológica de una insulina particular en una especie heteróloga, pero bastan para hacer que la insulina sea antigénica. Hoy en día, se utiliza ampliamente la insulina humana producida por bacterias con tecnología de bioingeniería de ácido desoxirribonucleico (DNA), y con ello se evita la formación de anticuerpos.¹²

1.6.1 Síntesis y metabolismo

Inicialmente se sintetiza como un precursor, la preproinsulina; se sintetiza en los ribosomas y entra al retículo endoplásmico de las células β , donde enzimas microsómicas la dividen con prontitud para formar la proinsulina. La proinsulina, que consiste en

cadena A y B unidas por un péptido C de 31 aminoácidos, se transporta al aparato de Golgi donde se introduce en las vesículas secretoras. Mientras se encuentra en la vesícula secretora, la proinsulina es dividida en dos sitios para formar la insulina y el fragmento péptido C y de pequeñas cantidades de proinsulina que escapan a la división. La insulina tiene una vida media en la circulación de 3 a 5 min y se cataboliza en el hígado como en los riñones. Alrededor del 50% de la insulina se cataboliza en el hígado en su primer paso por dicho órgano después de que se secreta a partir del páncreas hacia la vena porta. En contraste tanto el péptido C como la proinsulina sólo se catabolizan en los riñones, por ende, tienen vida media 3 a 4 veces más prolongada que la de la insulina en sí.¹⁵

Las hormonas anabólicas, incluida la insulina, favorece la síntesis de compuestos complejos en el cuerpo, cómo las proteínas y los aminoácidos. La insulina tiene varias funciones clave:

- Inducción del uso de glucosa, lo que disminuye su concentración sanguínea.
- Estimulación de la síntesis de proteínas.
- Estimulación de la síntesis y almacenamiento de lípidos.
- Facilitación del transporte de potasio, fosfato y magnesio hacia las células.
- La síntesis y disponibilidad de insulina depende del páncreas.¹³

1.6.2 Secreción

Los estímulos metabólicos más potentes para que la insulina se secrete son la glucosa y los aminoácidos que actúan de manera sinérgica. Los triglicéridos y los ácidos grasos solo

tienen un efecto estimulador pequeño. Como respuesta a la ingesta oral de glucosa, la secreción de insulina sucede en dos fases. La primera representa la liberación de insulina almacenada en los gránulos secretores. Aproximadamente 10 minutos después, cuando los gránulos secretores se han agotado, hay una liberación de insulina gradual y sostenida que puede durar por varias horas en individuos normales y que depende de la síntesis de nuevo de la hormona. La producción y liberación de insulina por la célula β , incluye los siguientes eventos celulares: la glucosa entra a la célula gracias al transportador de glucosa GLUT 2, de inmediato se fosforila por la enzima hexocinasa y se inicia la glucólisis que genera ATP lo que cierra los canales de potasio y se despolariza la membrana, esto induce la entrada de Ca^{2+} que a su vez moviliza la salida de la insulina de los gránulos secretores a través de la membrana de la célula β junto con el péptido C.¹⁵

1.6.3 Mecanismo de acción

Los receptores para insulina se hallan en muchas células corporales, incluidas aquellas donde dicha hormona no regula la captación de glucosa. El receptor de insulina, con peso molecular de 340 000, aproximadamente, es un tetrámero compuesto de dos subunidades α . Las subunidades α se unen a la insulina y son extracelulares, en tanto las subunidades β se sitúan a todo lo ancho de la membrana. Las porciones intracelulares de las subunidades β tienen actividad de tirosina cinasa. Los dos tipos de subunidades están glucosilados y los residuos “azucarados” se extienden al interior del líquido intersticial. La unión de la insulina activa la tirosina cinasa de las subunidades β y así se produce autofosforilación de dichas unidades a nivel de los residuos tirosínicos. La autofosforilación es necesaria para que la insulina ejerza sus efectos biológicos; también

activa la fosforilación de algunas proteínas citoplásmicas y la desfosforilación de otras, de modo predominante los residuos serínico y treonínico. El sustrato del receptor insulínico 1 (IRS-1) media algunos de los efectos en los seres humanos, pero existen también otros sistemas efectores. Por ejemplo, los ratones en los cuales se ha “eliminado” el gen del receptor insulínico muestran, desde la vida fetal, notable retraso del crecimiento, tienen anomalías del sistema nervioso central (SNC) y de la piel, y al nacer mueren por insuficiencia respiratoria, en tanto después de la ablación génica del sustrato del receptor insulínico 1, muestran sólo un retraso moderado del crecimiento en la vida fetal, viven y son resistentes a la insulina, pero por lo demás son casi normales. Los efectos anabólicos de la insulina en las proteínas que estimulan el crecimiento son mediados por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y los datos obtenidos indican que en invertebrados, la vía en cuestión participa en el crecimiento de células nerviosas y la orientación de axones en el sistema visual.¹⁶

1.7 DIABETES MELLITUS

1.7.1 Definición

La diabetes comprende un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por hiperglucemia debida a la deficiencia relativa o absoluta de insulina.

La NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, define a esta como: a la enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la

producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas. ¹⁷

1.7.2 Clasificación

1.7.2.1 Diabetes tipo 1

Se caracteriza por infiltración y destrucción de los islotes pancreáticos por células T reactivas contra el propio tejido. La NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, define a esta como: al tipo de diabetes en la que existe destrucción de células beta del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, casi siempre delgados y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia antes de los 30 años de edad. Se han identificado varias formas: La tipo 1A autoinmune; la tipo 1B y la LADA (diabetes autoinmune latente en adultos.) La tipo 1A es el resultado de un ataque autoinmune mediado por células citotóxicas contra las células B mientras que la tipo 1B es mucho menos frecuente y no tiene causa conocida, ocurre principalmente en los descendientes de africanos que tienen varios grados de deficiencia de insulina entre episodios esporádicos de cetoacidosis. La variante LADA se caracteriza por una progresión lenta en la deficiencia de insulina. Esta variante ocurre en aproximadamente 10% de los pacientes adultos, en un inicio los pacientes no requieren insulina y la mayoría progresan a formas dependientes de insulina. La diabetes tipo 1 contribuye solo con un 5 a 10 % de los casos, sin embargo, su incidencia continúa incrementando en todo el mundo y tiene serias implicaciones a corto y largo plazo. El manejo de la diabetes tipo 1

requiere la administración de insulina, el escrutinio de los niveles de glucosa sanguínea una dieta adecuada y la atención de las complicaciones asociadas con la diabetes.¹⁸

1.7.2.2 Diabetes tipo 2

La NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, define a esta como: al tipo de diabetes en la que hay capacidad residual de secreción de insulina, pero sus niveles no superan la resistencia a la insulina concomitante, insuficiencia relativa de secreción de insulina o cuando coexisten ambas posibilidades y aparece la hiperglucemia. Este tipo de diabetes, a menudo se relaciona con obesidad y estilo de vida sedentario; ésta se caracteriza por la resistencia a la insulina y deficiencia a la insulina. Es un grupo heterogéneo de pacientes, la mayoría obesos y/o con distribución de grasa predominantemente abdominal, con fuerte predisposición genética no bien definida (multigénica). Presentan niveles de insulina plasmática normal o elevada, sin tendencia a la acidosis, responden a dieta e hipoglucemiantes orales, aunque muchos con el tiempo requieren de insulina para su control.¹⁹

1.7.2.3 Otros tipos específicos de diabetes

Existen otros tipos específicos de diabetes, las cuales incluyen pacientes con defectos genéticos en la función de la célula beta como las formas llamadas MODY (por sus siglas en inglés *maturity-onset diabetes of the young*); otros pacientes tienen defectos genéticos que afectan la acción de la insulina; otros presentan patologías pancreáticas (pancreatectomía, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, neoplasia del páncreas,

hemocromatosis); también puede presentarse en endocrinopatías (Cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma). Algunos fármacos o tóxicos pueden producir diabetes secundaria (corticoides, ácido nicotínico, interferón α , pentamidina, etc.); puede originarse por agentes infecciosos (rubeola congénita, coxsachie B, citomegalovirus, parotiditis) y por último, algunas otras enfermedades como los Síndromes de Down, Klinefelter, Turner, enfermedad de Stiff-man y Lipoatrofias también pueden originar diabetes mellitus. En estos casos se hablan de diabetes secundarias. La diabetes gestacional se caracteriza por hiperglucemia, que aparece en el curso del embarazo, puede desaparecer al término del embarazo o persistir como intolerancia a la glucosa o diabetes clínica.¹⁵

1.7.3 Epidemiología

Las enfermedades crónicas se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento y de la prevención de las complicaciones. Los cambios en el comportamiento humano y los estilos de vida en el último siglo han provocado un gran incremento de la incidencia mundial de diabetes, sobre todo de tipo 2.

Alrededor del 8.2% de la población entre 20 y 69 años padece diabetes y, cerca del 30% de los individuos afectados, desconoce que la tiene. Esto significa que en nuestro país existen más de cuatro millones de personas enfermas, de las cuales poco más de un millón no han sido diagnosticadas. Una proporción importante de personas la desarrolla antes de los 45 años de edad, situación que debe ser evitada. Por otra parte, la mortalidad por esta causa muestra un incremento sostenido durante las últimas décadas, hasta llegar a ocupar el tercer lugar dentro de la mortalidad general.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que el número de personas con diabetes en el mundo es de 171 millones y pronostica que aumentará a 366 millones en el año 2030. En estudios realizados durante la década pasada se previó que la prevalencia se encontraba entre 8 y 9% en la población mexicana y se calcula que podrá llegar a 12.3% en el año 2025. En México, desde 1940 la diabetes ya se encontraba dentro de las primeras 20 causas de mortalidad, con una tasa de 4.2 por 100,000 habitantes.

A partir del 2000 la diabetes es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda y hombres. La diabetes genera un considerable efecto en los sistemas de salud, por ser de las principales causas de ingreso a hospitales de Secretaría de Salud durante el año 2000. Además la diabetes es la causa más frecuente de ceguera, insuficiencia renal terminal, amputaciones no traumáticas e incapacidad prematura, en México y en la mayoría de los países. Los efectos de esta enfermedad se magnifican al afectar con mayor frecuencia a grupos de población cuyos factores sociales o económicos limitan su acceso al tratamiento.²⁰

1.7.4 Enfoque terapéutico

El tratamiento óptimo para la diabetes ha sido tema de muchas opiniones y controversia con respecto al ajuste de la estrategia óptima de dosificación para cada individuo. De forma tradicional, la mayoría de los médicos que tratan pacientes diabéticos favorecen una estrategia por pasos, con la adición secuencial del tratamiento a fin de lograr y mantener las metas glucémicas. Es importante reconocer que el tiempo de presentación en la evolución de la enfermedad es muy variable y podría influir en el tratamiento inicial.¹ A fin de enfrentarse a tan grave problema, existe la Norma Oficial Mexicana NOM-015-

SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, esta define las acciones preventivas que realizan los sectores público, social y privado, así como los procedimientos para su detección, diagnóstico, tratamiento y control. Su aplicación pretende contribuir a reducir la incidencia que actualmente registra, evitar o retrasar sus complicaciones y disminuir la mortalidad por esta causa.¹⁶

1.7.5 Fisiopatología

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

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

La ausencia, déficit o resistencia a la insulina genera un estado de hiperglucemia, que es el aumento de la concentración sanguínea de glucosa, aunado a la incapacidad de transportar glucosa y aminoácidos al interior de las células que dependen de la insulina para este transporte. Hígado, músculo y células adiposas quedan privados de la glucosa como fuente energética y deben recurrir a otras fuentes menos eficientes para obtener energía como grasas corporales o incluso proteínas.^{12,13}

1.7.6 Fisiopatología de la Diabetes mellitus tipo 2

El factor de riesgo principal es la obesidad, resultado de influencias genéticas y ambientales; todos los individuos con sobrepeso tienen resistencia a la insulina, pero sólo los que no pueden compensarla mediante el incremento de la producción de insulina en las células β del páncreas desarrollan la diabetes tipo 2. No hay destrucción autoinmunitaria del páncreas, sino que la resistencia a la insulina o la disminución de la sensibilidad a la insulina de los tejidos metabólicos, como hígado, músculo esquelético, y tejido adiposo conducen a la utilización inadecuada de la glucosa. La obesidad favorece la resistencia a la insulina mediante la liberación de ácidos grasos y citocinas de las células adiposas. Estos compuestos interfieren con las señales de la insulina, alteran los receptores para insulina en las membranas plasmáticas de las células blanco e impiden que la insulina facilite la entrada de la glucosa a las células del hígado, músculo y tejido adiposo. La concentración insuficiente de insulina y la resistencia periférica a ésta, genera lo siguiente:

- Las células β no responden de manera adecuada a la concentración circulante de glucosa.
- La liberación hepática de glucógeno aunada a la supresión de la insulina por efecto del glucagón producen una concentración excesiva de glucosa circulante.
- Los receptores de insulina en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo no responden, lo que vuelve a estos tejidos resistentes de usar la insulina.

La secreción del glucagón aumenta de forma significativa; este es el que moviliza el glucógeno del hígado y suprime la secreción de insulina. Aunque no hay disminución en la cantidad de células β , la concentración elevada de lípidos séricos, como puede ocurrir con la obesidad, permite que la grasa se deposite en el páncreas, lo que causa esclerosis y afecta más su función. Al final este altera el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas.¹³

1.7.7 Manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2

Se caracterizan por varias anormalidades metabólicas, existen en algunos casos los síntomas típicos como: polidipsia, polifagia y poliuria. Sin embargo la mayor parte del tiempo las manifestaciones clínicas se deben a las complicaciones de largo plazo, como retinopatía, neuropatía o nefropatía diabética.^{12,13}

1.7.8 Complicaciones

Las complicaciones pueden ser agudas, son de inicio rápido y a menudo incluyen manifestaciones intensas de disfunción neuronal, entre ellas se encuentran la hipoglucemia, cetoacidosis diabética, coma hiperosmolar e hiperglucemia. Las complicaciones crónicas de la DM se desarrollan sobre todo en tejidos afectados por la concentración elevada de glucosa circundante; se clasifican en microvasculares, macrovasculares y neuropatías.¹³

1.8 TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento para la diabetes, es alcanzar en forma segura concentraciones de glucosa los más cercanas posible al intervalo fisiológico normal evitando la hipoglucemia. Además como la DM conlleva un riesgo cardiovascular y se acompaña de otros factores de riesgo en ese ámbito, otro objetivo terapéutico es mejorar dicho riesgo; sin embargo para esto, el ejercicio, la pérdida de peso y la dieta apropiada son bases importantes sobre las cuáles establecer el tratamiento para la diabetes y la consideración de estos aspectos aumentaría el control exitoso sobre la glucemia.²¹

1.8.1 Agentes Hipoglucemiantes orales

Son un conjunto heterogéneo de fármacos que se caracterizan por producir una disminución de los niveles de glucemia luego de su administración por vía oral, cumpliendo con este propósito a través de mecanismos pancreáticos y/o extrapancreáticos. Estos abarcan cuatro familias de drogas bien definidas¹⁷:

- Sulfonilureas
- Biguanidas
- Inhibidores de las α - glucosidasas
- Tiazolidinedionas

1.8.1.1 Sulfonilureas

En 1955, las sulfonilureas empezaron a ser muy utilizadas en el tratamiento de diabéticos no dependientes de insulina. Los compuestos son arilsulfonilureas con sustituciones en

los grupos benceno y urea. El mecanismo de acción de estos fármacos comprende efectos pancreáticos y extrapancreáticos. Los primeros incluyen un aumento de la estimulación a las células β del páncreas para la liberación de insulina, este efecto se produce por un bloqueo de la bomba K-ATPasa lo que se traduce en una despolarización prolongada de la membrana celular, con el consiguiente ingreso del Ca^{++} extracelular provocando la liberación de la insulina de los gránulos secretorios hacia el torrente sanguíneo. Al comienzo del tratamiento los niveles de insulina en sangre se elevan y la glucemia desciende, en tanto que con la administración crónica de sulfonilureas, los valores de insulina disminuyen hasta cifras pre-tratamiento, y se conservan valores reducidos de glucosa en plasma, el mecanismo íntimo de este proceso se desconoce en la actualidad, pero se supone que se debe a un aumento de la sensibilidad de los tejidos diana a la acción de la insulina, debido a la normalización de la glucemia y al predominio de los efectos extrapancreáticos. Los efectos extrapancreáticos comprenden fundamentalmente un aumento de los receptores de insulina en monocitos, eritrocitos y adipocitos; aumentan el efecto de la insulina y el número de transportadores para dicha hormona; producen inhibición de la gluconeogénesis hepática y aumento del consumo de glucosa a nivel periférico. La vía de administración es la oral. La absorción de todas, excepto glimepirida se altera con la presencia de alimentos en el tubo digestivo por lo cual se recomienda, para las de acción corta, la administración de la droga 30 minutos antes de las comidas. Las sulfonilureas circulan unidas en forma variable (70-99 %) a proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina. El metabolismo es fundamentalmente hepático, excepto la cloropropamida que se metaboliza escasamente (menos del 1%); la excreción es fundamentalmente renal, excepto la gliquidona que se elimina por vía biliar.

Las sulfonilureas pueden producir además trastornos gastrointestinales, reacciones hematológicas, trastornos hepáticos, reacciones disulfirámicas, efectos teratogénicos (por atravesar fácilmente la barrera placentaria), por último, producen hiponatremia al potenciar los efectos de la hormona antidiurética. La principal indicación de la sulfonilureas la constituyen los pacientes diabéticos no insulino-dependiente que no respondan al tratamiento dietético.²²

1.8.1.1.1 Glibenclamida

Derivado de la sulfonilurea. Promueve el aumento de la secreción de insulina por parte de las células β de los islotes del páncreas mediante un mecanismo aún no definido. Disminuye la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepática. Al parecer aumenta la sensibilidad a la insulina de los tejidos extrapancreáticos. Se produce una disminución de la glucemia sólo en aquellos pacientes capaces de sintetizar insulina; no influye en la producción de insulina por las células β , pero parece potenciar su liberación desde estas células pancreáticas. Su vida media es de 10 horas, el tiempo hasta la concentración máxima es de 4 horas; la absorción es rápida y su unión a las proteínas es muy elevada (90%). Se metaboliza en el hígado y sus metabolitos inactivos se excretan por vía biliar en 50% y el resto por el riñón.²³

1.8.1.1.2 Tolbutamida

Es un hipoglucemiante oral perteneciente a la familia de las sulfonilureas (clorpropamida, gliclazida, glibenclamida) que se emplea para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II

(no insulino-dependiente). Produce un aumento de la secreción de insulina y una reducción del umbral de sensibilidad a la glucosa de las células β y por sus efectos extrapancreáticos reduce la insulino-dependencia de los tejidos periféricos (resistencia a la insulina). Luego de su administración oral se absorbe en forma completa por la mucosa digestiva, iniciando su efecto a las 1-2 horas para llegar al máximo de las 2 a las 5 horas. Posee una larga vida media (5 horas), una elevada ligadura proteica (95%) y una amplia biodisponibilidad (85-100%). Sufre una activa biotransformación metabólica hepática, siendo su eliminación renal (85%) y biliar (9%).²²

1.8.1.2 Biguanidas

Dentro de esta familia de fármacos, se encuentra los agentes fenformina, buformina (ambas retiradas del mercado farmacéutico por sus graves efectos adversos) y metformina. Fundamentalmente es la inhibición de la gluconeogénesis hepática y el incremento de la glucólisis anaeróbica, con la consiguiente elevación de alanina, glicerol y ácido láctico. Otro mecanismo implicado es la disminución de la absorción intestinal de glucosa.^{9,10}

1.8.1.2.1 Metformina

Es un hipoglucemiante oral del grupo de las biguanidas. Buena absorción oral con una vida media plasmática de eliminación de 3 a 6 horas. Su mecanismo de acción es el aumento del número de receptores a la insulina. Se administra por vía oral, se absorbe en el intestino delgado. Su vida media es de 1.3 - 4.5 horas. El fármaco no se une a las

proteínas plasmáticas y se excreta sin cambios por la orina. Dentro de los efectos adversos los más frecuentes son de tipo gastrointestinal. El efecto adverso de mayor riesgo es la acidosis láctica. Su principal indicación la constituyen los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y obesidad, que no responden a la dieta ni al ejercicio físico. Se las puede utilizar sola o combinada con sulfonilureas o insulina.²²

1.8.1.3 Inhibidores de la α -glucosidasa

Las enzimas glucosidasa α se encuentran en el borde en cepillo del intestino, hidrolizan los oligosacáridos y polisacáridos no absorbibles en monosacáridos absorbibles. La inhibición de estas enzimas disminuye las excursiones prospandriales de glucosa y mejora el control de la glucemia. El fármaco debe estar en el intestino delgado en el momento de la absorción, por lo que se debe administrar antes o junto con la comida. La inhibición de esta enzima retrasa la absorción de la glucosa a la circulación sistémica, por lo que mejora la concordancia entre la aparición sistémica de la glucosa ingerida y la secreción amortiguada y tardía de insulina que existe en los diabéticos. Su principal indicación la constituyen pacientes con DM tipo 2 con valores de glucemia basales entre 140-180 mg/dl y glucemias postprandiales elevadas (entre 180-250 mg/dl), o aquellos casos en que exista contraindicación para el uso de sulfonilureas o metformina.²¹

1.8.1.4 Tiazolidinedionas

Dentro de este grupo se encuentran la troglitazona, la pioglitazona y la ciglitazona, la primera fue retirada del mercado por sus efectos hepatotóxicos. El mecanismo de acción

de estos fármacos se lleva a cabo mediante la unión al subtipo g del receptor nuclear de proliferación activado por peroxisomas, produciendo de esta manera un aumento en la transcripción de genes de las enzimas que normalmente son inducidas por la insulina, esta acción se lleva a cabo fundamentalmente en el tejido muscular y graso, todo esto se traduce en un aumento de la utilización periférica de glucosa. Otro mecanismo descrito es la inhibición de la gluconeogénesis hepática. La vía de administración es oral, circulan unidas a proteínas principalmente (99%) albúmina plasmática y se metabolizan por conjugación en sulfoconjugados, ácido glucurónico y quinonas. Se excreta fundamentalmente por vía biliar, por lo cual no se altera con la insuficiencia renal. Su principal indicación son los pacientes con diabetes tipo 2 con predominio de resistencia a la insulina, especialmente cuando existe intolerancia o contraindicación para el uso de metformina.^{18,21}

1.9 BAZO

El bazo es un órgano linfático situado en la parte superior izquierda del abdomen, con un peso aproximado de 150g. Consta de dos tipos de tejidos: la pulpa roja, que contiene células plasmáticas y macrófagos que vigilan los eritrocitos y los eliminan en caso necesario; y la pulpa blanca, que es el área linfóide y contiene áreas de células T y B residentes, no recirculantes, y que se reúnen para proporcionar inmunidad adaptativa.²⁴

1.9.1 Electroforesis en acetato de celulosa para determinar proteínas séricas.

Una partícula coloidea o un ión, provistos de carga eléctrica, emigran hacia el ánodo o el cátodo bajo la influencia de un campo eléctrico externo. Si las partículas tienen diferentes

velocidades de desplazamiento, puede aprovecharse esta propiedad para separarlas en distintas clases. El empleo de fuerzas eléctricas para lograr esta separación se llama electroforesis. Las distintas aplicaciones del principio de la electroforesis difieren principalmente por el medio en el cual tiene lugar la migración.

Las proteínas son separadas en la electroforesis de zona casi exclusivamente sobre la base de su carga eléctrica superficial. El medio de sostén es en teoría inerte y no impide ni estimula el flujo de las moléculas en el campo eléctrico. Generalmente se utiliza tiras de acetato de celulosa; éstas tienen la ventaja de presentar mayor rapidez en la migración electroforética. De manera adicional el acetato de celulosa es transparente, pueden aplicarse microcantidades de proteínas y es adaptable a los procedimientos histoquímicos de tinción. En la técnica las muestras son colocadas en el origen y separadas por electroforesis durante aproximadamente 90 minutos, empleando soluciones amortiguadoras alcalinas. Entonces se tiñen las tiras para la búsqueda de proteínas y se separan en un densitómetro.

En el densitómetro la tira teñida se pasa se pasa a través de un haz de luz. La absorción es variable debida a las concentraciones proteicas diferentes es descubierta por una celdilla fotoeléctrica y reproducida por un registrador análogo como un trazo. La separación convierte la configuración de la banda proteica en picos y permite la determinación cuantitativa de los principales picos. El suero humano normal es separado en 5 principales bandas electroforéticas por este método, la albúmina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β -globulina y γ -globulina.²⁵

1.10 HÍGADO

El hígado es el mayor órgano del cuerpo; en el adulto, representa cerca de 2 por 100 del peso corporal. Se encuentra en la parte alta de la cavidad abdominal, inmediatamente por debajo del diafragma, protegido por la parte inferior de la parrilla costal. Su unidad estructural es el lobulillo, de forma aproximadamente pentagonal o hexagonal en un corte transversal. En el centro se encuentra la vena central, vía de salida de la sangre del lobulillo, que desemboca en las venas supra hepáticas; a su vez estas se abren a la vena cava inferior.³⁰

Es uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica que desarrolla en el organismo. Dentro de sus funciones destacan: el almacenamiento de glucógeno, síntesis de ácidos grasos y conversión a cetonas, formación de lipoproteínas, colesterol y fosfolípidos, además de síntesis de proteínas plasmáticas, conversión y desaminación de aminoácidos y formación de urea; detoxificación de sustancias endógenas como la bilirrubina, bacterias, subproductos y sustancias exógenas como fármacos. El sistema de complemento está constituido por moléculas implicadas principalmente en la defensa frente a infecciones y células tumorales. Parte de los factores del complemento potencian la inflamación y la fagocitosis y actúan produciendo la lisis de células y microorganismos.

La mayor parte de los factores del complemento son proteínas plasmáticas y una pequeña proporción de ellos son proteínas de membrana. Muchos de los componentes del complemento (C2, C3, C4, C6, C7, C8, Factor B y Factor I) son polimórficos, es decir que existen diferentes formas alélicas que se expresan con distintas frecuencias en poblaciones o razas. El hepatocito es el principal productor de factores del complemento²⁹.

No obstante, por ejemplo los componentes de C1 son sintetizados por las células epiteliales del intestino y del sistema genito-urinario, C5 Y C8 son sintetizados principalmente en el bazo y los adipocitos sintetizan factor D. Se ha observado que los macrófagos activados producen algunos factores del complemento; sin embargo, esto solo tiene importancia, en el foco inflamatorio. Las citocinas inflamatorias (IL1, IL6 y TNF) e IFN- γ incrementan la síntesis de algunos factores del complemento en el hígado. Existen pruebas funcionales hepáticas que se pueden dividir en:

- a) Pruebas que informan sobre posible lesión hepatocelular o citólisis.
- b) Pruebas relacionadas con el metabolismo de la bilirrubina.
- c) Pruebas que analizan la síntesis hepática de sustancias necesarias para el funcionalismo corporal.

Dentro de las pruebas que informan de lesión hepatocelular o citólisis destacan las transaminasas o aminotransferasas. Éstas representan enzimas del metabolismo intermedio, que catalizan la transferencia de grupos amino del ácido aspártico o alanina al ácido acetoglutarico, formando ácido oxalacético y ácido pirúvico. En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son dos:

- a) Aspartato-aminotransferada o transaminasa glutámicooxalacética (AST O TGO) cuya vida media es de 48 horas.
- b) Alanino-aminotransferasa o transaminasa glutámico-pirúvica (ALT O TGP) con una vida media de 18 hrs.

La ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que la primera se localiza casi exclusivamente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos. La elevación sérica de transaminasas se correlaciona con el vertido a la sangre del contenido enzimático de los hepatocitos afectados, aunque la elevación enzimática puede no relacionarse con la gravedad de la lesión.²⁶

1.10.1 Marcadores enzimáticos TGP Y TGO

TGO

La TGO es una enzima bilocular, se encuentra distribuida en el citoplasma y en las mitocondrias de las células, junto a la TGP cumple un rol diagnóstico y de monitoreo de enfermedades con daño hepatocelulares y muscular. No hay evidencia de un aumento de síntesis de transaminasas en enfermedades hepáticas y musculares. Se encuentra en varios tejidos como el músculo cardíaco, hepático, cerebro, páncreas, pulmones, leucocitos y eritrocitos. Un aumento simultáneo de ambas concluye en un proceso de necrosis hepatocelular de cualquier índole. En algunos casos también se la usa en la evolución del infarto de miocardio (IAM), donde la sensibilidad diagnóstica es del 96% y la especificidad del 86% post angor. Debido a la localización intracelular de las transaminasas (TGP citoplasmática y TGO citoplasmática y mitocondrial) es que se puede inferir que ante un aumento significativo de TGP sobre TGO hay un daño celular difuso con ruptura de membranas celulares y compromiso citoplasmático y con un aumento de $TGO > TGP$ el compromiso necrótico es más profundo y severo. La magnitud del aumento

de ambas se correlaciona con la cantidad de células involucradas. El Índice de De Rittis (TGO/TGP) es menor de 1 cuando el daño es leve (citoplasmático) en los casos de hepatitis viral aunado a la menor vida media de la TGO con respecto a la TGP. Cuando supera a 1 y particularmente 2, la necrosis celular es profunda tal el caso de hepatitis alcohólicas o en hepatitis crónicas activas.

Su utilidad clínica abarca:

- Evaluar magnitud del daño celular en hígado y músculo.
- Monitoreo de la evolución del daño de los tejidos que la contienen hepatopatía, cardiopatías.

TGP

La alanina-aminotransferasa (ALT o TGP) es una enzima unilocular (citoplasmática) cuya mayor actividad se localiza en el parénquima del tejido hepático. En mucha menor proporción, se encuentra actividad de ALT en: músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos (en orden decreciente). La actividad de ALT en eritrocitos es 6 veces superior a la del suero. En la medida que se encuentren elevadas especialmente la ALT se debe inferir que el daño persiste. Los mayores aumentos de actividad ALT en suero se producen como consecuencia de alteraciones hepáticas (colestasis, hepatitis tóxicas o virales). La ALT tiene una sensibilidad clínica del 83% y una especificidad clínica del 84%. En una población con una prevalencia del 8% de enfermedades hepatobiliares, el valor predictivo positivo de la ALT fue de 31% y el valor predictivo negativo (exclusión de la enfermedad) fue del 98%. Esto quiere decir que en una población con un 8% de hepatopatías la ALT normal efectivamente excluye a los pacientes sanos, pero solo uno

de tres pacientes con ALT patológica tiene enfermedad hepática. La enzima ALT es más específica del daño hepático que el cociente AST/ALT. Comparando los valores de actividad ALT en suero con los de AST, es posible determinar el origen hepático o cardíaco de una alteración de los patrones enzimáticos. Además, es útil la relación AST/ALT en las hepatitis alcohólicas (con necrosis) este índice es generalmente >1 , mientras que en las hepatitis virales es generalmente <1 . La determinación de ALT adquiere importancia diagnóstica cuando sus valores se comparan con los de otras enzimas de similar origen tisular, permitiendo así completar el perfil enzimático de órganos como el hígado.

Su utilidad clínica abarca:

- Evaluar daño hepatocelular en magnitud y evolución
- Monitoreo de terapéutica hepatotóxica. De hepatitis crónicas.

Screening de hepatopatías junto con gamma GT y pseudocolinesterasa.²⁷

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus es uno de los padecimientos crónico degenerativos que se presentan en mayor proporción en la población mexicana, esto se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes debido a los altos costos de su tratamiento y de la prevención de las complicaciones. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que el número de personas con diabetes en el mundo es de 171 millones y pronostica que aumentará a 366 millones en el año 2030; así mismo los efectos de esta enfermedad se magnifican al afectar con mayor frecuencia a grupos de población cuyos factores sociales o económicos limitan su acceso al tratamiento farmacológico convencional.¹⁹

En México la gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales como alternativa al tratamiento tradicional. El uso empírico de estas ha perdurado hasta nuestros días y se ha convertido en la fuente principal de información para la producción de nuevos medicamentos en la industria farmacéutica. En México alrededor de 4 000 especies de plantas, aproximadamente 15% de la flora total tienen atributos medicinales, es decir una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa.³ El gordolobo es una planta medicinal que pertenece a la familia Asteraceae; misma que se encuentra dentro de las 7 familias más utilizadas como agentes hipoglucemiantes, de las 93 que existen en México.⁹

De aquí la importancia de realizar la evaluación farmacológica de la planta utilizada empíricamente por la población mexicana, con el propósito de aportar información relevante que justifique su uso terapéutico.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

1. Evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule* en un modelo de ratones CD1 hiperglucémicos.

3.1.2 Objetivos específicos

1. Recolectar e identificar la planta en estudio *Gnaphalium semiamplexicaule*.
2. Obtener el extracto etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule*.
3. Inducir la hiperglucemia temporal en los ratones mediante la aplicación subcutánea de glucosa al 50% (Dilución 1:10) al inicio del ensayo y a los 60 minutos.
4. Evaluar el efecto hipoglucemiante a tres diferentes dosis (25 mg/Kg, 50 mg/Kg y 100 mg/Kg) del extracto etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule* en ratones CD1.
5. Comparar la actividad hipoglucemiante del extracto etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule* con fármacos hipoglucemiantes de referencia (Glibenclamida y Tolbutamida).
6. Realizar las pruebas serológicas correspondientes según el órgano dañado, para evaluar la toxicidad del extracto etanólico en un modelo subagudo en ratones CD1.

IV. HIPÓTESIS

El gordolobo (*Gnaphalium sp*) es utilizado empíricamente como agente hipoglucemiante por la población mexicana, por lo que se espera que el extracto etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule* muestre efectos en la disminución de los niveles de glucosa al ser administrado en un modelo de ratones CD1.

V. MATERIAL

Material biológico

- 36 Ratones CD1, con un peso promedio de 40 g, machos.
- 24 Ratones CD1, con un peso promedio de 35 g, machos
- Suero fresco de ratón

Reactivos

- Solución de Glucosa al 50%
- Goma Gathi al 1%
- Flor de Gordolobo (*Gnaphalium semiamplexicalule*)
- Agua destilada
- Extracto etanólico del gordolobo
- Colorante de rojo de Ponceau al 5% en solución acuosa de TCA al 7.5%
- Ácido acético glacial al 5% en agua
- Etanol
- Solución decolorante (solución acuosa al 40% de N-metil pirrolidona)

Fármacos

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

Material de laboratorio

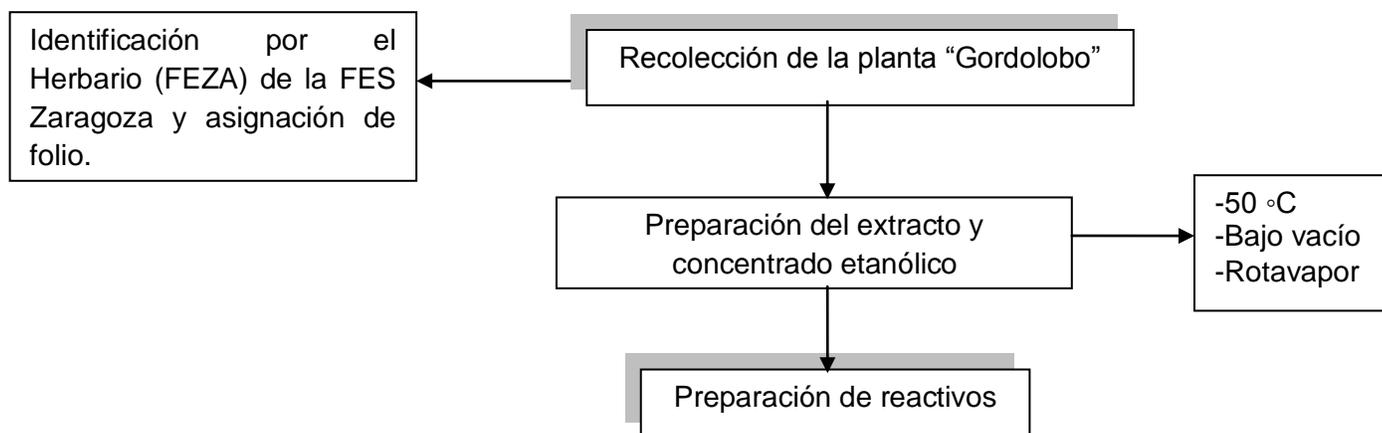
- Matraz bola
- Tubos de ensaye
- Espátula de acero inoxidable
- Matraz Erlenmeyer de 1L
- Cajas Petri
- Estuche de disección
- Vaso de precipitados 10, 50 y 100 mL
- Pipetas graduadas de 1,5, y 10 ml
- Embudo Büchner
- Jeringas de 10,5, y 1 ml
- Jeringas de insulina
- Tabla de disección
- Gasas

-
- Termómetro
 - Horno de microondas
 - Estufa
 - Centrífuga
 - Bomba de alto vacío
 - Vortex
 - Molino de plantas
 - Glucómetro AccuCheck® Performa.
 - Equipo de electroforesis Sepratek (Gelman)
 - Cámara de electroforesis Sepratek
 - Membranas de acetato de celulosa
 - Multiaplicador de muestras (Gelman)
 - Equipo automatizado ILAB 600

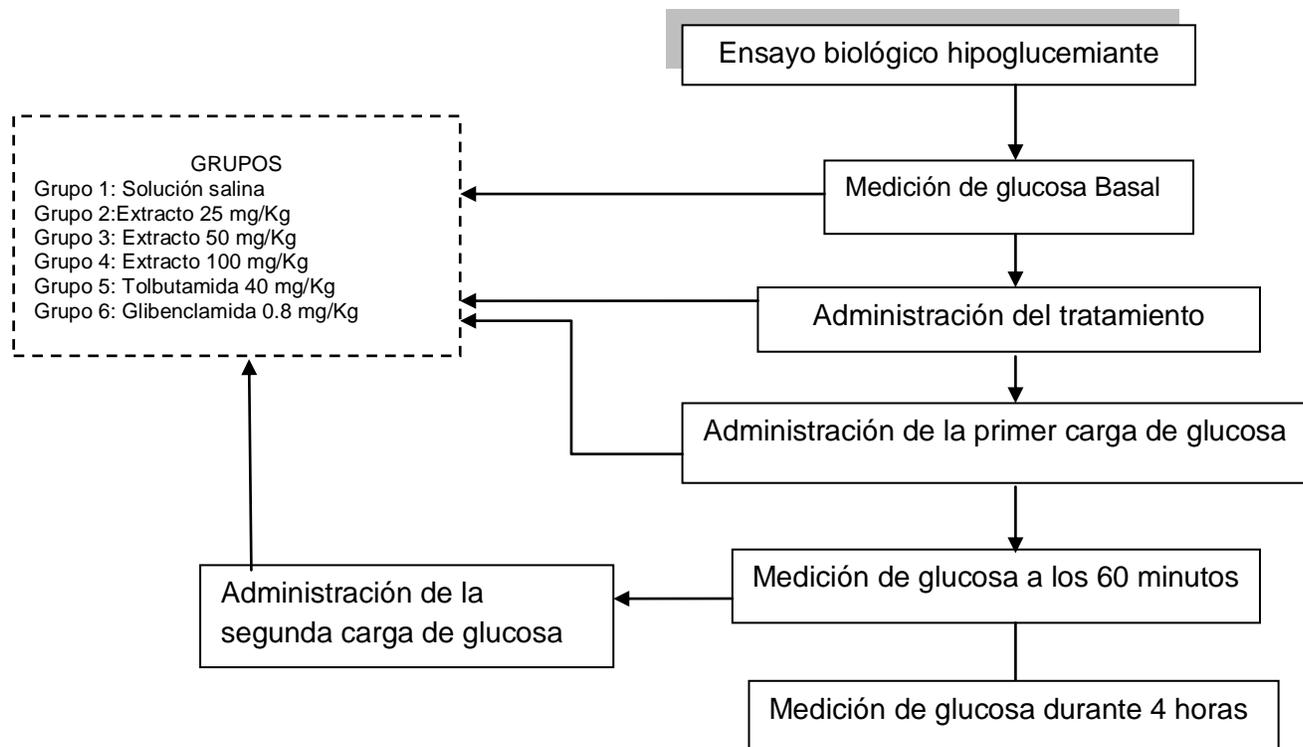
VI. MÉTODOS

DIAGRAMA DE FLUJO

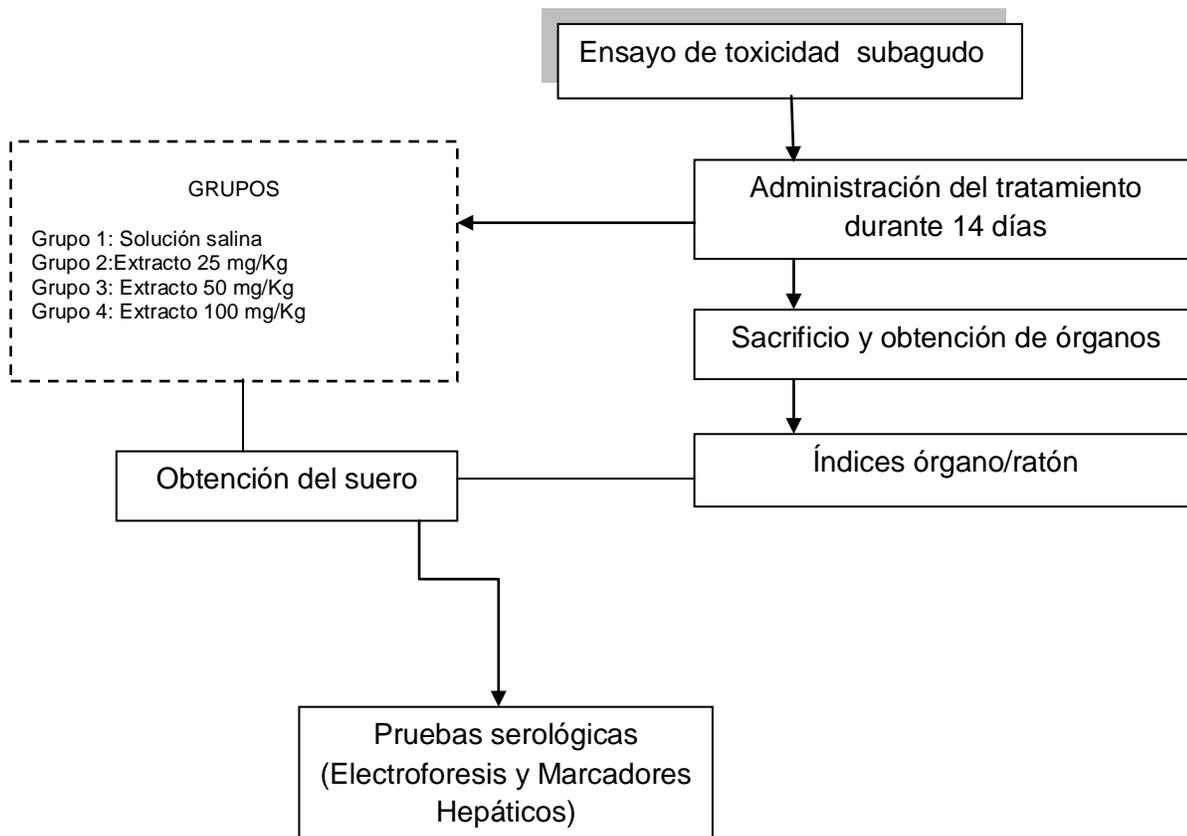
1. Recolección e identificación de la planta, y elaboración del extracto etanólico.



2. Ensayo biológico hipoglucemiante



3. Ensayo de toxicidad agudo



6.1 Elaboración del extracto y concentrado etanólico.

Se recolectó la planta conocida como Gordolobo, en el mercado municipal “Las águilas” del municipio de Nezahualcóyotl. Se autenticó en el herbario FEZA-UNAM de la FES Zaragoza, para la asignación de un número de identificación.

1. Se pesaron 200 g de la flor de gordolobo y se trituraron en un molino de plantas.
2. Se realizó el extracto etanólico de la planta, dejando dos noches en etanol a temperatura ambiente la planta molida, en un matraz Erlenmeyer de 1L.
3. Posteriormente se filtró utilizando un embudo de vidrio y gasas.
4. Enseguida se filtró al vacío utilizando papel Whatman del No.2
5. Una vez filtrado el extracto etanólico de gordolobo, se eliminó el disolvente a una temperatura de 50 °C y bajo vacío, con la ayuda de un rotavapor. Una vez obtenido el concentrado del extracto etanólico, se dejó secar por dos días a temperatura ambiente, posteriormente se mantuvo en un recipiente de vidrio ámbar en refrigeración, hasta su utilización.

6.2 Preparación de reactivos.

Los reactivos se prepararon el mismo día que se realizó el ensayo biológico.

1. Para el grupo control se utilizó solución salina como tratamiento.
2. Se preparó una suspensión de goma Ghatti al 1%, calentando en ciclos de 10 segundos en el horno de microondas.
3. Se preparó una suspensión inicial del extracto de gordolobo en goma Ghatti al 1%, a una dosis de 100 mg/Kg, y se realizó una dilución 1:2 para obtener la dosis de

50 mg/Kg; de esta última se realizó la misma dilución para obtener la dosis 25 mg/Kg conformando las dosis de los grupos experimentales.

4. Para los grupos testigo positivo, se prepararon suspensiones en goma Ghatti al 1% utilizando como referencia dos fármacos hipoglucemiantes: Glibenclamida (Dosis 0.8 mg/Kg) y Tolbutamida (Dosis 40 mg/Kg).
5. Así mismo se realizó una dilución 1:10, de una solución inicial de glucosa al 50% (Dosis de 2mg/kg) para ser administrado en dos cargas (Dosis de 4mg/kg), al tiempo 0 (ti) y a los 60 minutos (t1) durante el ensayo biológico para la inducción de hiperglucemia.

6.3 Actividad hipoglucemiante. Ensayo biológico.

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

Los ratones se sometieron a un periodo de ayuno de 16 horas, antes del ensayo.

1. 36 ratones se distribuyeron al azar y se dividieron en 6 grupos de 6 animales; se marcó y se pesó a los ratones conformando los siguiente grupos:

Grupo #	Grupo/ Tratamiento/Dosis
Grupo 1	Grupo control-Solución salina
Grupo 2	Grupo experimental-Extracto (Dosis 25 mg/Kg de peso)
Grupo 3	Grupo experimental-Extracto (Dosis 50 mg/Kg de peso)
Grupo 4	Grupo experimental-Extracto (Dosis 100 mg/Kg de peso)
Grupo 5	Grupo testigo positivo-Tolbutamida (Dosis 40 mg/Kg de peso)
Grupo 6	Grupo testigo positivo-Glibenclamida (Dosis 0.8 mg/Kg de peso)

-
2. Se midió la glucosa basal al tiempo 0 (ti), por un corte de la parte distal de la cola para obtener la muestra de todos los grupos, utilizando un glucómetro Accu-Check® Performa.
 3. Inmediatamente se administró por vía oral los diferentes tratamientos: Para el grupo 1, se le administró un volumen constante de 0.2 ml de solución salina. Para los grupos experimentales se administró los volúmenes calculados del extracto etanólico de gordolobo para las dosis de (25, 50 y 100 mg/kg) al grupo 2, 3 y 4 respectivamente. Posteriormente se administró los volúmenes calculados de Tolbutamida (40 mg/Kg de peso) al grupo 5, y Glibenclamida (0.8 mg/Kg de peso) al grupo 6.
 4. Una vez administrados los tratamientos, se administró la primera carga de glucosa de una solución al 50% diluida 1:10 vía subcutánea, con una dosis de 4 mg/Kg de peso repartida en dos dosis con un intervalo de tiempo de 1 hora, a todos los grupos al tiempo 0 (ti) para la inducción a la hiperglucemia.
 5. Se midió la glucosa al tiempo 1 (60 minutos) de todos los grupos después de la primera carga e Inmediatamente se administró una segunda carga de glucosa a todos los grupos.
 6. Se midió la glucosa al tiempo 2, 3 y 4 (120, 180, y 240 minutos respectivamente) posteriores a la segunda carga de esta en todos los grupos²⁸.
 7. Con los resultados se comparó el efecto del extracto a sus diferentes concentraciones, los dos hipoglucemiantes como control positivo y la solución salina como control negativo y se analizaron los resultados mediante una ANOVA con una confianza al 95%, al existir diferencias estadísticas se procedió a realizar

la prueba por contrastes ortogonales (*post hoc*) de Tukey, mediante el programa SPSS versión 21.

6.4 Modelo de toxicidad subagudo

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

1. Se distribuyeron al azar 24 ratones CD1 formando 4 grupos de seis animales cada uno; se marcó y se pesó a los ratones conformando los siguientes grupos:

Grupo #	Grupo/ Tratamiento/Dosis
Grupo 1	Grupo control-Solución salina
Grupo 2	Grupo experimental-Extracto (Dosis 25 mg/Kg de peso)
Grupo 3	Grupo experimental-Extracto (Dosis 50 mg/Kg de peso)
Grupo 4	Grupo experimental-Extracto (Dosis 100 mg/Kg de peso)

2. Se administró por sonda gástrica los volúmenes calculados de las diferentes dosis (25 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg) del extracto etanólico de *Gnaphalium semiamplexicaule* durante 14 días.
3. Se observaron los ratones diariamente para identificar alguna anomalía corporal y de comportamiento.
4. Después de los 14 días se sacrificaron los animales por medio de un corte en el plexo axilar con la previa anestesia con éter.

-
5. Se colectó la sangre en tubos Eppendorf y se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 5 minutos para separar el suero y realizar las pruebas serológicas posteriormente.
 6. Se pesaron los ratones al final del ensayo.
 7. Se extrajeron los órganos: hígado, corazón, bazo y riñones y se pesó cada uno de ellos para obtener la relación de peso órgano/ratón.
 8. Por medio del programa SPSS ver.21, se realizó un estudio estadístico ANOVA para identificar diferencias significativas entre las medias de los índices, y se realizó la prueba por contrastes ortogonales (*post hoc*) de Tukey.
 9. Se realizaron pruebas serológicas correspondientes según el órgano dañado.

6.5 Pruebas serológicas

6.5.1 Electroforesis en acetato de celulosa para determinar proteínas séricas.

1. Se tomó la membrana de acetato de celulosa y se sumergió en el amortiguador de alta resolución Electra®HR Buffer durante 10 minutos.
2. Se llenó la cámara de electroforesis con el amortiguador de corrimiento.
3. Se secó la membrana con un papel filtro.
4. Se colocó la membrana con la ayuda de unas pinzas sobre el soporte de la cámara y se tensó.

-
5. Se tomó con un aplicador múltiple las muestras de suero y se colocaron sobre la membrana siguiendo las guías de la cámara.
 6. Se conectó la cámara a la fuente y se aplicó 200 V durante 20 minutos.
 7. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau S ácido tricloroacético (TCA) al 7.5% durante 10 minutos.
 8. Se eliminó el exceso de colorante sumergiendo la membrana en una solución acuosa de ácido acético al 5%.
 9. La membrana se escurrió y se colocó en solución clarificadora durante 5 minutos.
 10. Se colocó la membrana sobre un vidrio desengrasado y se seco con una secadora de aire hasta lograr que la membrana se transparente.
 11. Se leyó la membrana en un software de análisis de imágenes "ImageJ".

6.5.2 Determinación de marcadores enzimáticos TGP Y TGO.

Se determinaron las enzimas TGP Y TGO por medio de un equipo automatizado ILAB 600.

VII. RESULTADOS

La planta fue autenticada en el herbario de la FES Zaragoza (FEZA)-UNAM por la M en C Ma. Magdalena Ayala Hernández. Se le asignó el número FEZA 13450 y un voucher del espécimen fue depositado en este herbario. 200 g del material se secaron y se molieron, se obtuvo un extracto etanólico de la planta a una temperatura de 50 °C y bajo vacío, con la ayuda de un rotavapor. Se obtuvo un rendimiento del 5.7%.

7.1 ENSAYO HIPOGLUCEMIANTE

Gráfica 7.1.1. Al tiempo 2 (120 min.) los valores representan las medias \pm el error estándar, a una $^b p < 0.05$ para los grupos 5 y 6.

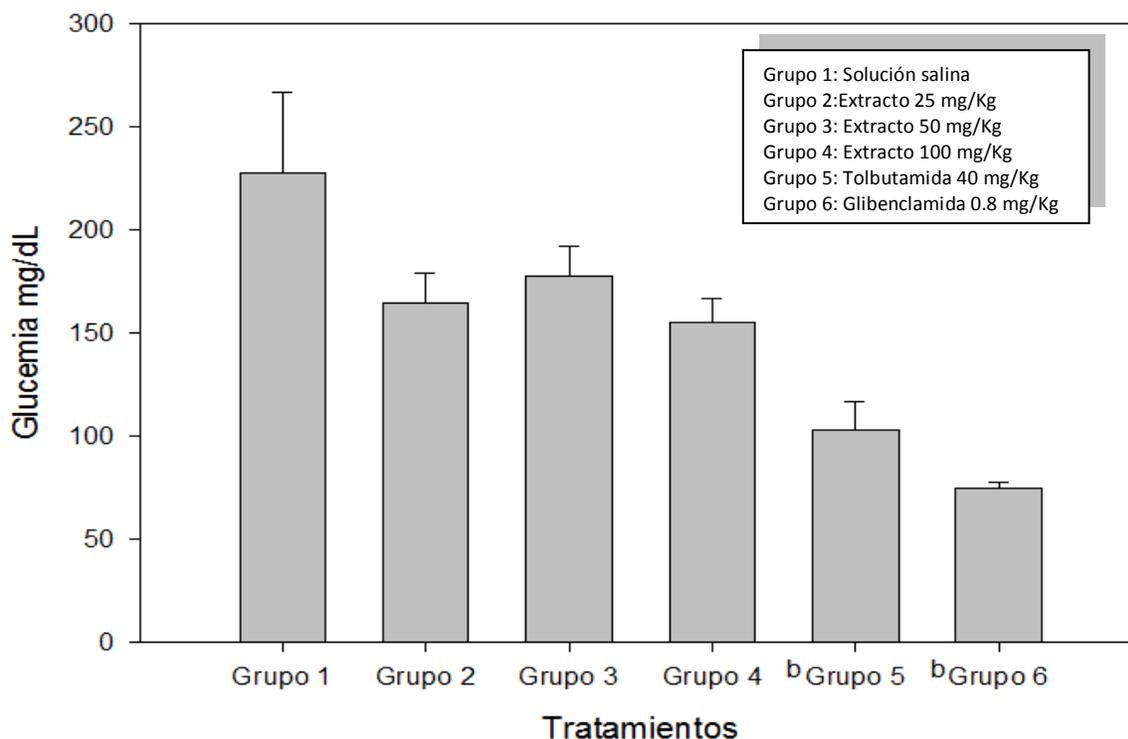


Tabla 7.1.1 Resultados de la prueba *post hoc* de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 2 (120 min).

Tratamiento/Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Glibenclamida/0.8 mg/kg	6	74.50*		
Tolbutamida/40 mg/kg	6	103.33*	103.33*	
Extracto/100 mg/kg	6	155.17	155.17	155.17
Extracto/50 mg/kg	6		177.67*	177.67*
Extracto/25 mg/kg	6		164.83*	164.83*
Solución Salina	6			227.50*
Sig.		.070	.113	.131

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.*

Gráfica 7.1.2 Al tiempo 3 (180 min.) los valores representan las medias \pm el error estándar, a una ^bp<0.05 para los grupos 4, 5 y 6.

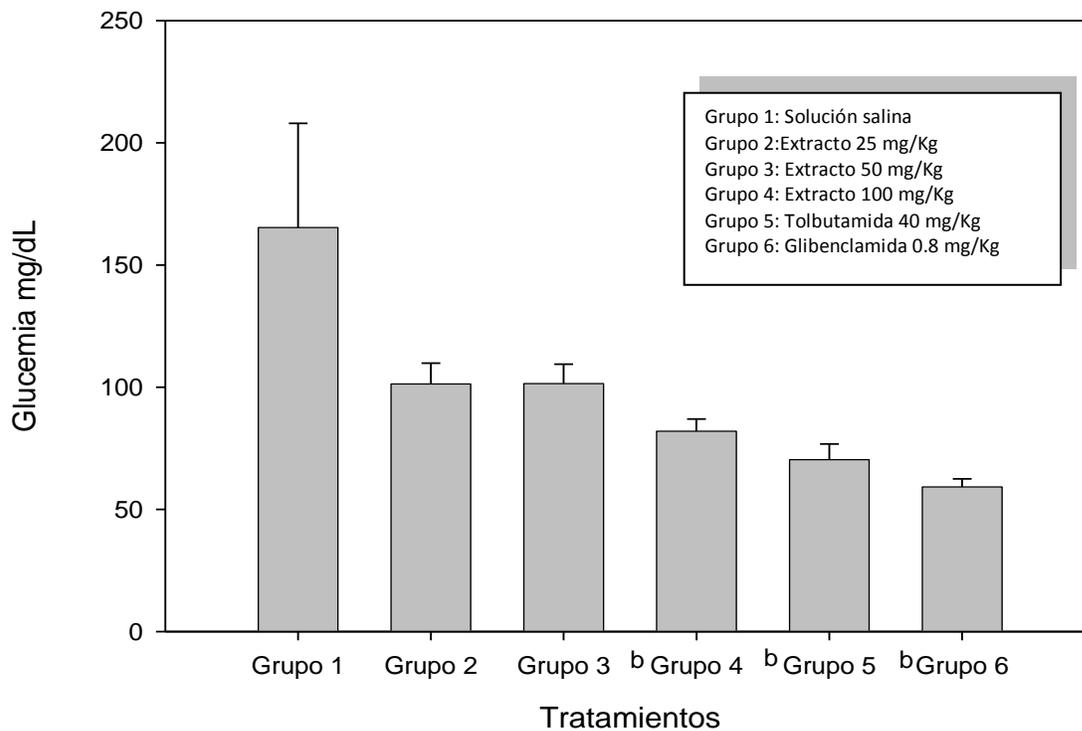


Tabla 7.1.2 Resultados de la prueba *post hoc* de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 3.

Tratamiento/Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Glibenclamida/0.8 mg/kg	6	59.17*	
Tolbutamida/40 mg/kg	6	70.33*	
Extracto/100 mg/kg	6	82.00*	
Extracto/50 mg/kg	6	101.50	101.50
Extracto/25 mg/kg	6	101.33	101.33
Solución salina	6		165.33*
Sig.		.587	.168

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.*

Gráfica 7.1.3 Al tiempo 4 (240 min.) los valores representan las medias \pm el error estándar, a una ^bP<0.05 para los grupos 5 y 6.

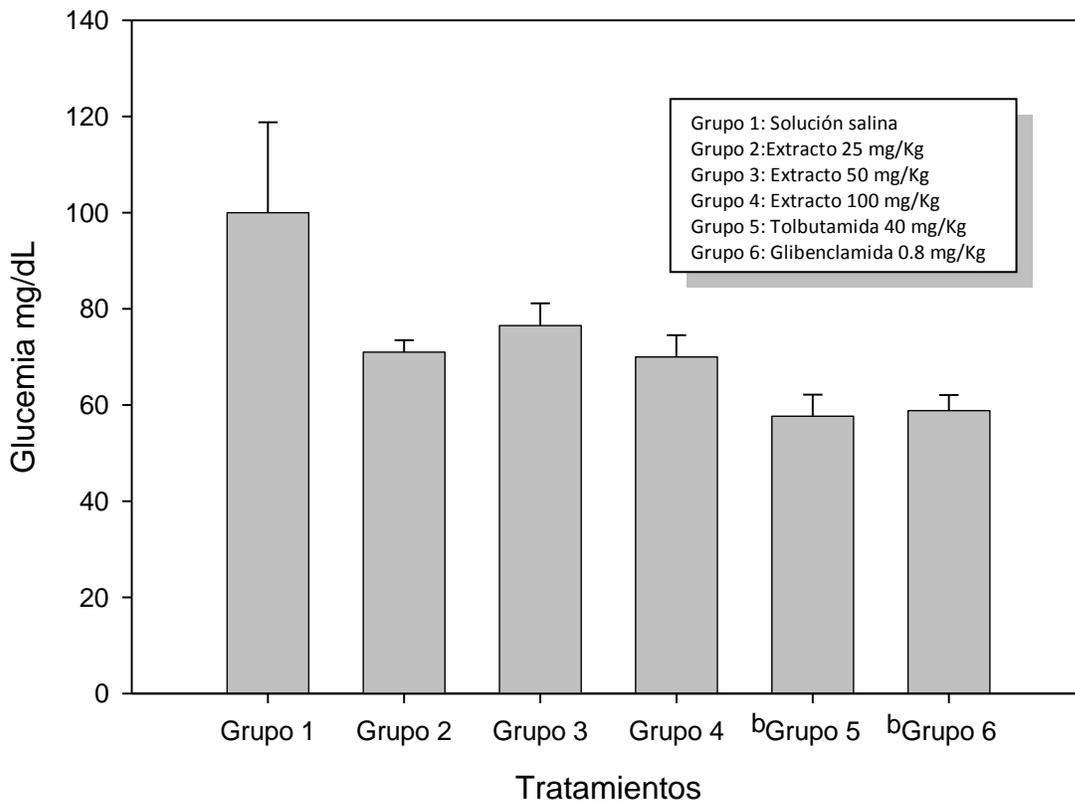


Tabla 7.1.3 Resultados de la prueba *post hoc* de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en el tiempo 4.

Tratamiento/Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Tolbutamida 40 mg/kg	6	57.67*	
Glibenclamida 0.8 mg/kg	6	58.83*	
Extracto 100 mg/kg	6	70.00	70.00
Extracto 25 mg/kg	6	71.00	71.00
Extracto 50 mg/kg	6	76.50	76.50
Solución salina	6		100.00*
Sig.		.624	.156

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.*

7.2 ENSAYO DE TOXICIDAD SUBAGUDA

Tabla 7.2.1 Resultados de la prueba *post hoc* de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la prueba de toxicidad Subaguda en hígado.

Tratamiento/Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Solución Salina	6	4.95817*	
Extracto/100mg	6	5.77450	5.77450
Extracto/50mg	6		6.05883*
Extracto/25mg	6		6.39117*
Sig.		.123	.319

La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.*

Tabla 7.2.2 Resultados de la prueba post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la prueba de toxicidad Subaguda en bazo.

Tratamiento/Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Solución salina	6	.29333*	
Extracto/25mg/kg	6	.36000	.36000
Extracto/50mg/kg	6	.37533	.37533
Extracto/100mg/kg	6		.39717*
Sig.		.085	.665

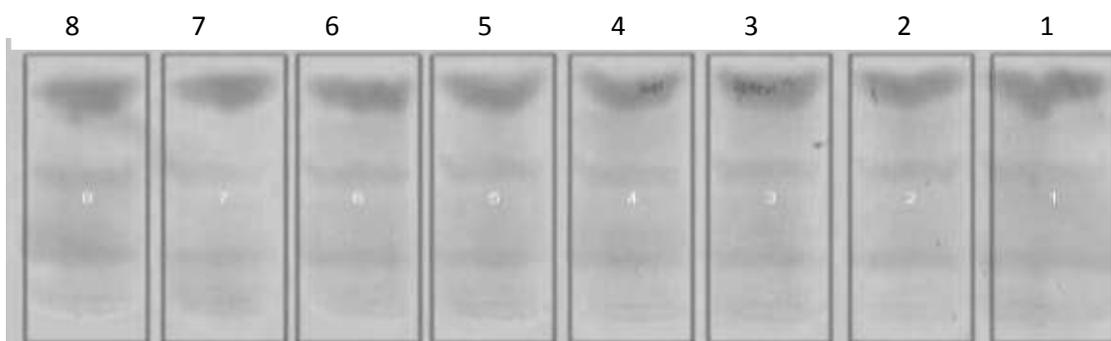
La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.*

7.2.1 Electroforesis de proteínas séricas

Se realizó una electroforesis de proteínas séricas, con el propósito de ver una alteración en las fracciones de las proteínas y comprobar si la esplenomegalia se debía a una alteración de las células linfáticas productoras de inmunoglobulinas (fracciones β y γ), o bien componentes de complemento sintetizados principalmente en bazo como C5 y C8.

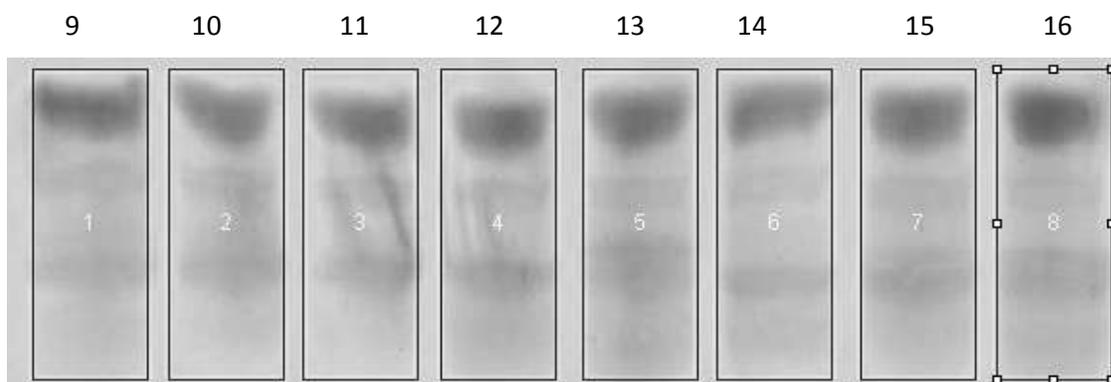
7.2.1 ELECTROFORESIS

Carriles 1



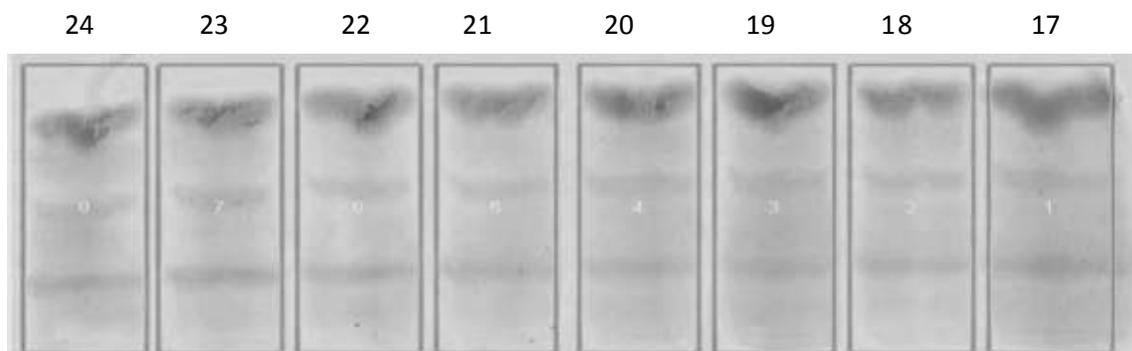
Grupos del 1-6 Tratamiento: solución salina, 7-12 Tratamiento: Extracto (25 mg/kg)

Carriles 2

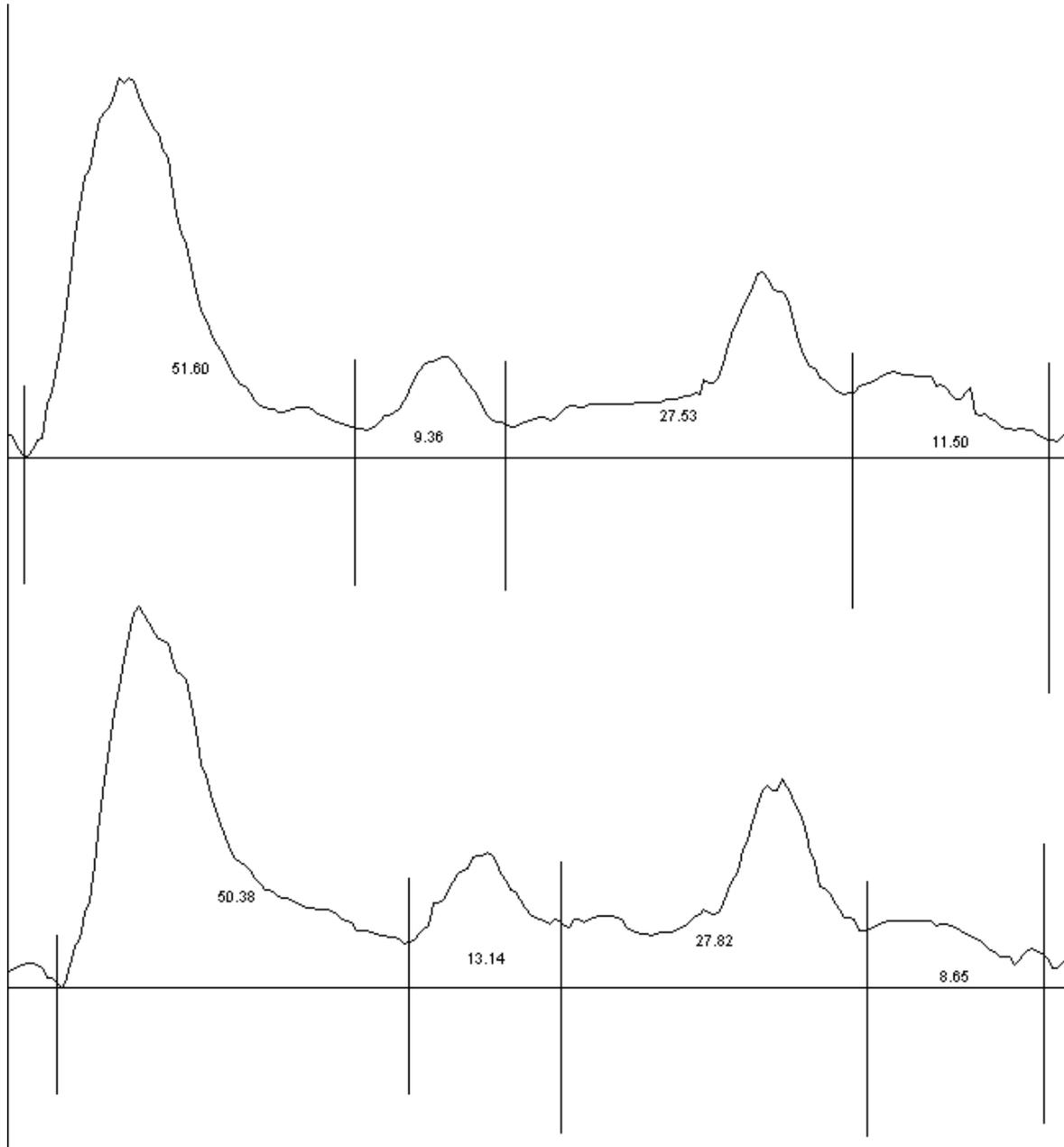


Grupos del 13-18 Tratamiento: Extracto (50 mg/kg), 18-24 Tratamiento: Extracto (100 mg/kg)

Carriles 3



7.2.1.1 Ejemplo de Proteinogramas arrojados por el software de análisis de imagen ImagepJ.



7.2.2 Enzimas hepáticas

Tabla 7.2.2.1 Resultados de la prueba post hoc de Tukey para la formación de subconjuntos de los tratamientos en la determinación de TGP.

Tratamiento/Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Extracto/Dosis 50mg/kg	6	41.8333	
Extracto/Dosis 100mg/kg	6	48.0000	
Solución salina	6	50.1667	
Extracto/Dosis 25 mg/Kg	6		*63.1667
Sig.		.274	1.000

XI. DISCUSIÓN

La mayoría de los principios activos de las plantas con la actividad hipoglucemiante se deben evaluar en animales con páncreas sano. Por esa razón se siguió un modelo de animales hiperglucémicos y no modelos donde se dañe páncreas de los animales con el uso de alloxana y estreptozotocina, ambos modelos de diabetes insulino-pénica. Se usaron dos hipoglucemiantes como son la tolbutamida y la glibenclamida, el primero con efecto principalmente en la gluconeogénesis y el segundo su acción principal es sobre páncreas utilizados en el tratamiento de Diabetes tipo 2.

Para el ensayo biológico fue necesario inducir la hiperglucemia en los ratones después de la carga de glucosa vía subcutánea; esto para no dañar páncreas y observar la actividad hipoglucemiante de cada uno de los tratamientos administrados. Esto permitió observar la disminución de la glucemia a lo largo del ensayo.

Se realizó el análisis estadístico ANOVA utilizando el programa SPSS versión 21.0 y se realizó una prueba por contrastes ortogonales (*post hoc*) de Tukey.

Al tiempo 0 y al tiempo 1 (60 min.) no se presentaron diferencias estadísticas significativas a una $P \geq 0.05$ de los niveles de glucemia, entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, como se muestra en las gráficas del apartado 7.1 al tiempo 2 (120 min.), 3 (180 min.) y 4 (240 min.) existen diferencias entre las medias con una $P < 0.05$.

En la prueba por contrastes ortogonales (*post hoc*) de Tukey, se observó que al tiempo 2 (Tabla 7.1.1) existe la separación de tres subconjuntos, el primero engloba a la tolbutamida y la glibenclamida utilizados como testigos positivos en este ensayo, así como el extracto a una dosis de 100 mg/kg, esto se interpreta como que a esa dosis existe

actividad hipoglucemiante por encontrarse en ese subconjunto. Sin embargo en el subconjunto 2 engloba sólo a la tolbutamida y a las diferentes dosis del extracto (25, 50 y 100 mg/kg) sin incluir a la solución salina que fue utilizado como testigo negativo, lo que también sugiera actividad hipoglucemiante a estas dosis. El subconjunto 3 engloba sólo a las dosis del extracto y a la solución salina interpretándose que este subconjunto no tiene actividad hipoglucemiante.

La dosis de 100 mg/kg destaca por pertenecer al subconjunto 1 y sugiere un comportamiento igual a los testigos positivos, además de presentar medias más bajas, en comparación con las que presenta el tratamiento con solución salina; al mismo tiempo se encuentra en el subconjunto 2 al igual que la tolbutamida, esto sugiere un mecanismo de acción similar al de la tolbutamida actuando a nivel de páncreas.

Para el tiempo 3 (180 minutos) se puede apreciar que la dosis de 100 mg/kg a los 180 minutos llega a tener un comportamiento similar a un hipoglucemiante (Tabla 7.1.2) por encontrarse en el mismo subconjunto que los controles positivos, esto sugiere que es la dosis óptima del extracto de la cual se puede partir para producir este efecto; a diferencia de las dosis más bajas, que se observan igualmente en el subconjunto 2 donde se encuentra el testigo negativo.

Así mismo, las dosis de 25 y 50 mg/Kg se comparten igualmente en el subconjunto 1, sin embargo se encuentran en el subconjunto 2 englobando también a la solución salina lo que indica una posible actividad hipoglucemiante disminuida. Al tiempo 4 (240 min) se observa que la Glibenclamida y Tolbutamida siguen su acción hipoglucemiante, sin embargo la dosis del extracto a 100 mg/kg que presentó actividad al tiempo 3, se

comparte nuevamente en los dos subconjuntos (Tabla 7.1.3). Esto se interpreta como que su actividad hipoglucemiante disminuye.

Es posible que la dosis de 100 mg/kg no sea suficiente para continuar con el efecto hipoglucemiante, ya que como se muestra en la tabla anterior, aparece nuevamente en los dos subconjuntos. Cabe resaltar que las medias están disminuidas a las concentraciones de 25 y 50 mg/kg, pero no llegan a diferenciarse completamente del control negativo.

No se realizaron mediciones de glucemia al tiempo 5, debido a que el ayuno fue de 16 hrs. Al realizar el estudio de toxicidad subagudo, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las medias de los índices de hígado y bazo mediante la prueba de ANOVA.

En la tabla 7.2.1 se observan dos subconjuntos, donde la diferencia significativa de los índices se presenta a una dosis de 50 y 25 mg/kg respecto a la media de la solución salina en el hígado, siendo esto un indicador de un posible daño celular hepático a estas dosis.

Así mismo, en el bazo se obtuvo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) sólo a una dosis de 100 mg/kg como se observa en la Tabla 7.2.2.

Debido a que se detectó diferencias significativas entre los índices órgano/ ratón del hígado y bazo, indicando esplenomegalia se realizaron pruebas específicas para cada órgano debido a que son los principales indicadores de daño celular.

No se encontraron diferencias significativas con una $P \geq 0.05$ entre las diferentes fracciones de proteínas (α , β y γ). Esto implica que no hay alteración a este nivel según los marcadores evaluados.

Al realizar la pruebas de enzimas hepáticas, se realizó un estudio estadístico ANOVA donde se encontraron diferencias significativas a una $P < 0.05$ entre las medias de las enzimas transaminasa glutámico piruvica (TGP o ALT) contra las diferentes concentraciones del extracto y el testigo negativo, a una dosis de 25 mg/kg. (Tabla 7.2.2.1) Lo anterior sugiere que la actividad microsomal del hígado está alterada en relación al grupo control.

En la determinación de TGO, no se encontraron diferencias significativas de las medias entre los grupos tratados y el grupo control de esta enzima. Los marcadores enzimáticos TGP Y TGO, sugiere daño celular cuando se encuentran niveles elevados en plasma; la TGP, es una enzima específica de hígado e implica mayor actividad en el parénquima del tejido hepático.

X. CONCLUSIÓN

Se autenticó la planta en el herbario de la FES Zaragoza (FEZA)-UNAM donde se le asignó el número FEZA 13450. A sí mismo se obtuvo el extracto etanólico de la misma con un rendimiento del 5.7%. Las diferencias estadísticas significativas encontradas en el ensayo demuestran que el extracto etanólico de *Gnaphalium semiplexicaule* "Gordolobo", tiene actividad hipoglucemiante a la dosis de 100 mg/kg de peso. En el ensayo de toxicidad subaguda los animales mostraron esplenomegalia a esta misma dosis; sin embargo en el estudio electroforético no presentaron alteraciones en las células linfáticas productoras o en los componentes del complemento sintetizados principalmente en bazo; a la dosis de 25 mg/kg del extracto se presentaron valores elevados del marcador TGP lo que sugiere una alteración celular hepática. En el tratamiento de la DM tipo 2, el uso de plantas medicinales depende en gran medida del sustento científico que pueda facilitar además de información, confiabilidad para seguir ésta práctica cotidiana.

XI. PROPUESTA

- Realizar el estudio comparativo hipoglucemiante del extracto del gordolobo, en medio acuoso y con diferentes disolventes al utilizado.
- Realizar el ensayo comparativo hipoglucemiante con la dosis de 100 mg/kg como la más baja, ya que fue a esta donde se presentó la actividad hipoglucemiante.
- Consideramos que debe de realizarse un conteo de células presentes en el bazo entre los grupos y determinar cuáles células están alteradas en el modelo de intoxicación, debido a que no fue estadísticamente significativo pero si es clínicamente relevante.

XII. ANEXOS

ANEXO 1

1.1 Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se inmovilizará a los ratones dentro de un cilindro de plástico, el cual tiene un orificio que permitirá que la cola quede expuesta.
2. Con unas tijeras quirúrgicas se hará un corte en la parte distal de la cola, y se obtendrá una gota de sangre.

1.2 Determinación de glucosa con el glucómetro AccuCheck® Performa.

1. Se utilizará un frasco nuevo de tiras reactivas, y se introducirá el chip que viene dentro de éste en el glucómetro.



2. Se extraerá una tira reactiva del frasco y se volverá a cerrar herméticamente.
3. Se insertará el extremo dorado de la tira en la ranura de tiras del medidor, éste encenderá automáticamente y aparecerá en la pantalla un número (código).



-
4. Se debe asegurar de que el código que se encuentra en el medidor coincide con el código en el frasco de tiras reactivas.
 5. Cuando se observe una gota de sangre parpadeando en la pantalla del medidor, se acercará la gota de sangre al extremo amarillo de la tira (NO se deberá dejar caer la gota de sangre sobre la tira).
 6. En la pantalla aparecerá el símbolo del reloj de arena, si no aparece significará que la muestra de sangre fue insuficiente y hay 5 segundos para repetir el paso anterior.
 7. Después de ver el resultado de la prueba, se extraerá la tira del medidor y se desechará.
 8. Se utilizará una tira reactiva para cada muestra.

1.3 Descripción del Glucómetro Accu-Check® Performa

Determinación de glucosa; Principio de la prueba

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

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

Las tiras reactivas Accu-Chek Performa han sido diseñadas con una Tecnología inteligente, que le permite detectar y corregir influencias externas como temperatura,

humedad , daño en la tira reactiva o muestras insuficiente de sangre, evitando que ellas interfieran en el resultado.

Finalidad de uso

Tiras reactivas para pruebas cuantitativas de glucemia en sangre capilar, arterial o neonatal fresca así como en sangre venosa anti coagulada con heparina de (litio o sodio) o con EDTA. Sólo para uso con el medidor ACCU-CHEK Performa. El rango de medición es 10-600 mg/Dl.

Contenido del estuche

Estuche de tiras reactivas, 1 chip de codificación y prospectos.

Todos los artículos contenidos en el estuche se pueden eliminar en la basura doméstica. Dado que hay solo cantidades sumamente pequeñas de sustancias reactivas, éstas no se consideran material peligroso de conformidad con las regulaciones de la UE.

Especificaciones del medidor ACCU-CHECK® Performa

- **Pantalla LCD**
- **Apagado automático:** Después de 2 minutos
- **Suministro de energía:** Una pila de litio CR 2032 o equivalente
- **Tipo de medidor:** Medidor Accu-Chek Performa
- **Rango de medición:** 10-600 mg/dL
- **Tamaño de muestra:** 0.6µL
- **Tiempo de medición:** Aproximadamente 5 segundos
- **Condiciones de operación del sistema:** 6 °C a 44 °C; 10 a 90 % de humedad relativa.

-
- **Condiciones de almacenamiento del medidor:** De -40°F a 158°F (de -40°C a 70°C)
 - **Rango de humedad relativa para operación:** Menos del 85%
 - **Altitud:** < 10,150 pies
 - **Capacidad de memoria:** 500 valores de glucosa en sangre con hora y fecha,
Promedios semanales, quincenales y mensuales
 - **Dimensiones:** 93 x 52 x 22 mm (largo, ancho, alto).
 - **Peso:** 62 grs. aprox. con pila incluida.
 - **Construcción:** Portátil

ANEXO 2

Tabla 2.1 ANOVA para el ensayo biológico hipoglucemiante.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
T1	Inter-grupos	3312.806	5	662.561	1.583	.195
	Intra-grupos	12557.500	30	418.583		
	Total	15870.306	35			
T2	Inter-grupos	89369.667	5	17873.933	7.650	.000
	Intra-grupos	70089.333	30	2336.311		
	Total	159459.000	35			
T3	Inter-grupos	42450.222	5	8490.044	4.192	.005
	Intra-grupos	60760.333	30	2025.344		
	Total	103210.556	35			
T4	Inter-grupos	7124.333	5	1424.867	3.297	.017
	Intra-grupos	12963.667	30	432.122		
	Total	20088.000	35			
Ti	Inter-grupos	1157.139	5	231.428	.979	.447
	Intra-grupos	7093.833	30	236.461		
	Total	8250.972	35			

Tabla 2.2 ANOVA para ensayo de toxicidad.

ÓRGANO		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
HEPÁTICO	Inter-grupos	6.754	3	2.251	6.146	.004
	Intra-grupos	7.327	20	.366		
	Total	14.081	23			
RENAL	Inter-grupos	.031	3	.010	.588	.630
	Intra-grupos	.356	20	.018		
	Total	.388	23			
CARDIACO	Inter-grupos	.002	3	.001	.245	.864
	Intra-grupos	.054	20	.003		
	Total	.056	23			
ESPLENICO	Inter-grupos	.036	3	.012	3.822	.026
	Intra-grupos	.063	20	.003		
	Total	.099	23			

Tabla 2.3. ANOVA para electroforesis de proteínas séricas.

Proteínas séricas		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ALBÚMINA	Inter-grupos	81.188	3	27.063	1.685	.202
	Intra-grupos	321.266	20	16.063		
	Total	402.454	23			
ALFA	Inter-grupos	33.290	3	11.097	1.261	.314
	Intra-grupos	175.978	20	8.799		
	Total	209.268	23			
BETA	Inter-grupos	119.156	3	39.719	2.557	.084
	Intra-grupos	310.703	20	15.535		
	Total	429.859	23			
GAMMA	Inter-grupos	30.899	3	10.300	1.347	.287
	Intra-grupos	152.922	20	7.646		
	Total	183.821	23			

Tabla 2.4. ANOVA para enzimas hepáticas.

Enzimas		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
TGP	Inter-grupos	1449.458	3	483.153	8.076	.001
	Intra-grupos	1196.500	20	59.825		
	Total	2645.958	23			
TGO	Inter-grupos	3388.792	3	1129.597	2.789	.067
	Intra-grupos	8099.833	20	404.992		
	Total	11488.625	23			

ANEXO 3 Fotografías



Fotografía 1. Gordolobo. Autenticado en el Herbario FEZA- FES Zaragoza UNAM.

XIII. REFERENCIAS

1. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. [Disponible en:<http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Js2299s/4.html>] [Consultada en 12 febrero 2013].
2. Osorio DEJ. Aspectos básicos de la farmacognosia. 2009 [Disponible en <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>] [12 febrero 2013]
3. Ocegueda, S. Moreno E, Koleff P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Rev Biodiversitas.2005;(62):12-15. [Disponible en <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>] [Consultada en 25 de febrero 2013].
4. Bello González MA, Salgado Garciglia R. Plantas medicinales de la Comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. Rev Biológicas. 2007. (9):126-138.
5. García de Alba García JE, Ramírez Hernández BC, Robles Arellano G, Zañudo Hernández J, Salcedo Rocha AL, García de Alba Verduzco JE. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. Rev Desacatos. 2012, 29-44.
6. Gonzales Elizondo M, López Enriquez I, Gonzalez Elizondo MS, Tena Flores JA. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. México. 2004,11-31 [Disponible en:<http://www.libros.publicaciones.ipn.mx/PDF/1490.pdf>] [Consultada en 13 feb 2013]
7. Oubre AY, Carlson TS, King SR, Reaven GM. 1997. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM
8. Balleza, JJ. La familia asteraceae en el estado de zacatecas (México). Instituto de Biología, UNAM. Departamento de Botánica; 6-12.

-
-
9. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99 (2005) 325–348.
 10. Instituto de Biología. *Gnaphalium semiamplexicaule* DC. UNIBIO: Colecciones Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.[Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn23373>] [Consultada en 5 de marzo 2013]
 11. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana [Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7553>] [Consultada en 8 de marzo de 2013]
 12. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
 13. Ganong WF. Fisiología médica. 23ª ed. México: McGrawHill; 2010, 315-335.
 14. Braun C, Anderson CM. Fisiopatología un enfoque clínico. 2ª edición. Barcelona: Wolters Kluwer; 2012,470-483.
 15. Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina Clínica. 6ª ed. México:Mc-GrawHill.Lange.497-522, 413-437.
 16. Aguilar-Salinas, C. A., E. Reyes-Rodriguez, et al. Early-onset type 2 diabetes:metabolica and genetic characterization in the mexican population. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*;2001, 86:220-226.
 17. Modificación a la norma oficial mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. Subsecretaría de prevención y control de enfermedades de coordinación de vigilancia epidemiológica.
 18. Daneman, D.Type 1 Diabetes. *Lancet*. 2006; 367: 847-858.
 19. Scott A. Waldman, Andre Terzic. Farmacología y terapéutica, principios para la práctica. México:Editorial El Manual Moderno;2010, 557-570.

-
-
20. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la encuesta nacional de salud de2000.[Disponible:http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes_mellitus.pdf] [Consultada en 8 marzo 2013]
 21. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la encuesta nacional de salud de2000.[Disponible:http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/diabetes_mellitus.pdf] [Consultada en 8 marzo 2013]
 22. Chaves Ortiz R, Del Vaega RB. Hipoglucemiantes orales: propiedades farmacológicas y usos terapéuticos. Rev de Posgrado de la Cátedra VIa Medicina. 2001:8-12.
 23. P.R. Vademécum. [CD-ROM]. México: Informed S.A. de C.V.; 2012.
 24. Parham P. El sistema Inmune. 3ra ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2011;pp 21-28
 25. Danielp. Stites, John D. Stobo, H. Hugh Fundenberg, Vivian Wells. Inmunología básica y clínica. México: Editorial el manual moderno;1985.
 26. García M, Zurita A. Transaminasas: Valoración y significación clínica Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.
 27. Lothar T. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results. English edition;1998.
 28. Marroquin-Segura R, Flores PM, García BMM, Mora GJLA, Sanchez RJF, Aguilar CA. Efecto antihiper glucémico de un extracto acuoso de *Colubrina elliptica*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2005;36:27-32.
 29. Henry J. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio.9ª edición. México:Científicas y técnicas. 1991,179-185.
 30. Stevens A; Lowe J. Anatomía patológica. 2da. Edición. Madrid: Hacourd. 2001:36-60.