



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA *Iztapalapa*



POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD”

MECANISMO DE ACCIÓN HIPOGLUCEMIANTE DE EXTRACTOS  
OBTENIDOS DE PLANTAS ANTIDIABÉTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

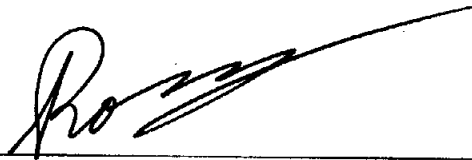
**B. E. Tania Rosario Banderas Dorantes**

Co-Directores: Dra. María G. Campos Lara  
Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar  
Asesor: Dr. Rubén Román Ramos

México D.F.


23 Mayo del 2006

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada MECANISMO DE ACCIÓN HIPOGLUCEMIANTE DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE PLANTAS ANTIDIABÉTICAS que presenta la alumna Banderas Dorantes Tania Rosario, para obtener el grado de Maestría en Biología Experimental con fecha de 23 de Mayo del 2006.



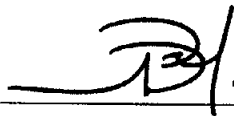
---

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
rrr@xanum.uam.mx; rromanr@cablevision.net.mx



---

DR. EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA  
FACULTAD DEL MEDICINA UNAM. DEPTO. FARMACOLOGÍA  
casam@servidor.unam.mx



---

DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN  
pgdm@xanum.uam.mx

## **Miembros del Comité Tutorial**

**CO-DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MARÍA G. CAMPOS LARA  
JEFA UIM-FARMACOLOGÍA CMNS XXI, MIEMBRO DEL SISTEMA  
NACIONAL DE INVESTIGADORES NIVEL II.**

**CO-DIRECTOR DE TESIS  
DR. FRANCISCO J. ALARCÓN AGUILAR  
PROFESOR TITULAR “C” UAM-I, MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL  
DE INVESTIGADORES NIVEL I.**

**ASESOR DE TESIS  
DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS  
PROFESOR TITULAR “C” UAM-I, MIEMBRO DEL SISTEMA NACIONAL  
DE INVESTIGADORES NIVEL II.**

**Esta tesis fue realizada, financiada y apoyada por la UIM-Farmacología del IMSS Siglo XXI bajo la dirección de la Dra. María G. Campos Lara y la UAM-I bajo la dirección del Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar y la asesoría del Dr. Rubén Román Ramos.**

**La Maestría en Biología Experimental de la UAM-I se encuentra dentro del padrón de Programas de Posgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro UAM-I: 309-0 y clave del programa PIFOP-CONACYT-SEP es C/PFPN-2002-35-32. Agradezco al CONACYT por la beca otorgada con número 185595 y al IMSS por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 99091929.**

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada MECANISMO DE ACCIÓN HIPOGLUCEMIANTE DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE PLANTAS ANTIDIABÉTICAS que presenta la alumna Banderas Dorantes Tania Rosario, para obtener el grado de Maestría en Biología Experimental con fecha de 23 de Mayo del 2006.

---

**DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS**  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
[rrr@xanum.uam.mx](mailto:rrr@xanum.uam.mx); [rromanr@cablevisión.net.mx](mailto:rromanr@cablevisión.net.mx)

---

**DR. EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA**  
FACULTAD DEL MEDICINA UNAM. DEPTO. FARMACOLOGÍA  
[casam@servidor.unam.mx](mailto:casam@servidor.unam.mx)

---

**DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA.**  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN  
[pdqm@xanum.uam.mx](mailto:pdqm@xanum.uam.mx)

***Lo que es bueno para ti puede no serlo para otros.  
Entonces, ¿qué te hace pensar que tu manera es la mejor?***

**Anónimo**

## **LA CORTESÍA**

**La vida, por breve que sea, nos deja siempre tiempo para la cortesía.**

**La cortesía es el más exquisito perfume de la vida y tienen tal nobleza y generosidad que todos la podemos dar; hasta a aquellos que nada poseen en el mundo. El *Señor de las cortesías* les concede el gracioso privilegio de otorgarla.**

***¿En qué abismo de pobreza, de desnudez, no puede caber la amable divinidad de una sonrisa, de una palabra suave, de un apretón de manos?***

**Amado Nervo**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN: Diabetes mellitus</b> .....	12
I.1 Antecedentes históricos	
I.2 Definición	
I.3 Signos y síntomas	
I.4 Clasificación	
a. DM tipo 1	
b. DM tipo 2	
c. DM gestacional	
d. Otros tipos específicos	
I.5 Factores de riesgo	
I.6 Diagnóstico	
I.7 Control	
a. Dieta	
b. Ejercicio	
c. Tratamiento farmacológico	
i) Insulina	
ii) Agentes hipoglucemiantes orales (AHO)	
❖ Biguanidas	
❖ Inhibidores de alfa glucosidasas	
❖ Derivados de tiazolidinedionas	
❖ Sulfonilureas	
d. Plantas medicinales	
i) <b><i>Catharanthus roseus</i></b>	
ii) <b><i>Cucurbita ficifolia</i></b>	
iii) <b><i>Ibervillea sonora</i></b>	
iv) <b><i>Plantago major</i></b>	
v) <b><i>Psacalium peltatum</i></b>	
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	38
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	41
IV.1 Objetivo general	
IV.2 Objetivos particulares	
<b>V. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	42
V.1 Material vegetal	
V.2 Obtención y caracterización de los extractos	
V.3 Animales de experimentación	
V.4 Ensayos biológicos con los extractos	

V.5 Estudio del efecto hipoglucémico producido por los extractos en ratones sanos	
V.6 Estudio del efecto en los niveles séricos de insulina producido por cinco extractos en ratones sanos y diabéticos	
V.7 Evaluación del potencial bloqueador de los $K_{ATP}$ de dos extractos	
V.8 Análisis estadístico	

<b>VI. RESULTADOS</b> .....	48
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	58
<b>VIII. CONCLUSIÓN</b> .....	61
<b>IX. REFERENCIAS</b> .....	62



## RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizado por hiperglucemia, debida a la producción insuficiente de insulina o falta de acción de esta hormona. La DM actualmente es considerada un problema grave de salud pública.

El tratamiento de la DM frecuentemente se realiza con base en el uso de agentes hipoglucemiantes orales del tipo de las sulfonilureas, que al bloquear los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), incrementan la secreción de insulina. Sin embargo, el control de la DM en México también se realiza a través del uso de plantas medicinales, algunas han sido evaluadas experimental y clínicamente; demostrándose que varios extractos y fracciones presentan actividad hipoglucemiante, desconociendo cuál sea su mecanismo de acción. Considerando que estos extractos y fracciones vegetales sólo son activos en modelos con DM tipo 2 inducida experimentalmente, es probable que su mecanismo de acción sea aumentar la secreción de insulina de manera similar a como lo hacen las sulfonilureas. En este trabajo de investigación se estudió el efecto que tienen algunos extractos hipoglucemiantes, obtenidos de 5 plantas antidiabéticas, de modificar la concentración de insulina en suero y se estudió la capacidad de bloquear los canales  $K_{ATP}$  en aorta torácica de rata.

Para lograr estos objetivos, se seleccionaron cinco especies vegetales, cuyo efecto hipoglucémico fue validado experimentalmente en estudios previos. Se obtuvieron los extractos de *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum* y se administraron a ratones sanos para corroborar su efecto hipoglucémico. Los estudios para evaluar el efecto de los extractos en la concentración de insulina en suero se realizaron con ratones sanos y con diabetes inducida por aloxana. Los estudios para evaluar la capacidad de bloquear los canales  $K_{ATP}$  se realizaron en aorta torácica de rata usando un polígrafo Grass. Se indujo la contracción del tejido con fenilefrina y se determinó la relajación del tejido a diferentes dosis de diazóxido. Una vez establecidas las condiciones experimentales iniciales del estudio se procedió a incubar los tejidos con DMSO/Etanol (vehículo), glibenclamida (control positivo) o los extractos bajo estudio y se administró nuevamente fenilefrina y diazóxido a los tejidos.

Los resultados mostraron que todos los extractos evaluados reducen de manera estadísticamente significativa la glucosa en sangre de ratones sanos con respecto al control. A partir de los extractos con mayor actividad, denotada como aquellos que provocaron la disminución de la concentración media de glucosa en sangre durante la prueba, mayor al 10% de la reducción producida por la tolbutamida, fueron seleccionados cinco de ellos para estudiar su efecto en la concentración de insulina en suero y dos extractos fueron evaluados como inhibidores de los canales  $K_{ATP}$ .

Los resultados obtenidos para estudiar el efecto de la administración por vía intraperitoneal (ip) de los extractos sobre la concentración de insulina en suero mostraron que *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae* y *Psacalium peltatum* disminuyen de manera estadísticamente significativa la concentración de glucosa sanguínea de ratones diabéticos con respecto al control. Se observó que los extractos de *C. ficifolia*, *I. sonorae* y *P. peltatum* incrementaron la concentración de insulina en suero, sin embargo, este incremento no resultó estadísticamente significativo.

Con respecto a los resultados de los estudios *in vitro*, se observó que ninguna de las dosis estudiadas de *C. roseus* bloquearon los canales  $K_{ATP}$  en aorta torácica de rata. Por otra parte, la dosis más baja del extracto diclorometánico de *I. sonorae* mostró tendencia a bloquear los canales  $K_{ATP}$  sin ser, esta acción, dependiente de la dosis.

## Abstract

The diabetes mellitus (DM) it is a group of metabolic illnesses characterized by hyperglycaemia, due to the insufficient production of insulin or lack of action of this hormone. The DM at the moment a serious problem of public health is considered.

The treatment of the DM frequently is carried out with base in the use of agents oral hypoglycaemics of the type of the sulfonylureas that when blocking the dependent channels of potassium of ATP ( $K_{ATP}$ ), they increase the secretion of insulin. However, the control of the DM in Mexico is also carried out through the use of medicinal plants, some have been evaluated experimental and clinically; being demonstrated that several extracts and fractions present activity hypoglycaemic, ignoring which its mechanism of action. Considering that these extracts and vegetable fractions are only active in models with DM type 2 induced experimentally, it is probable that their mechanism of action is to increase the secretion of insulin in a similar way to as they make it the sulfonylureas. In this investigation work the effect was studied that have some extracts hypoglycaemic, obtained of 5 plant antidiabetics, of modifying the concentration of insulin in serum and the capacity was studied of blocking the channels  $K_{ATP}$  in thoracic aorta of rat.

To achieve these objectives, five vegetable species were selected whose effect hypoglycaemic was validated experimentally in previous studies. The extracts of *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora*, *Plantago major* and *Psacalium peltatum* were obtained and they were administered to healthy mice to corroborate their effect hypoglycaemic. The studies to evaluate the effect of the extracts in the concentration of insulin in serum were carried out with healthy mice and with diabetes induced by alloxan. The studies to evaluate the capacity to block the channels  $K_{ATP}$  were carried out in thoracic aorta of rat using a polygraph Grass. The contraction of the tissue was induced with phenylephrine and the relaxation the tissue was determined from to different diazoxide dose. Once established the conditions experimental initials of the study you proceeded to incubate the tissue with DMSO/Etanol (vehicle), glibenclamide (positive control) or the extracts under study and it was administered phenylephrine and diazoxide again to the tissues.

The results showed that all the valued extracts reduce statistically in way significant the glucose in blood of healthy mice with regard to the control. Starting from the extracts with more activity, denoted as those that caused the decrease of the half concentration of glucose in blood during the test, bigger to 10% of the reduction taken place by the tolbutamide, five of them were selected to study their effect in the concentration of insulin in serum and two extracts were evaluated like inhibitors of the channels  $K_{ATP}$ .

The obtained results to study the effect of the administration for via intraperitoneal (ip) of the extracts on the concentration of insulin in serum showed that *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae* and *Psacalium peltatum* diminish statistically in way significant the concentration of glucose in blood of diabetic mice with regard to the control. It was observed that the extracts of *C. ficifolia*, *I. sonorae* and *P. peltatum* increased the concentration of insulin in serum, however, this increment was not statistically significant.

With regard to the results of the studies in vitro, it was observed that none of the studied doses of *C. roseus* blocked the channels  $K_{ATP}$  in thoracic aorta of rat. On the other hand, the lowest dose in the extract diclorometanic of *I. sonorae* showed tendency to block the channels  $K_{ATP}$  without being, this dependent action of the dose.

## **I. INTRODUCCIÓN: Diabetes mellitus**

### **I.1 Antecedentes históricos**

La palabra diabetes proviene del griego *dia* “a través de”, y *betes* “pasar”, mientras que *mellitus* “dulce” proviene del latín. Los primeros datos históricos de la diabetes aparecen en los textos médicos de culturas ancestrales hace más de 2000 años, fue descrita en el siglo II DC, por Arateus de Capadocia (139-200), médico asiático que describió la diabetes desde el punto de vista clínico. Síntomas como poliuria y polidipsia, fueron descritos en el papiro de Ebers, el tercer libro de epidemias de Hipócrates y el Nei Ching. Los hindúes mencionan en los textos de ayurveda los síntomas, descritos en el papiro de Ebers, además de la glucosuria, aliento con olor a acetona y diferenciaron dos tipos de diabetes, uno heredado y el otro adquirido por la obesidad. Entre los tratamientos registrados para esos desórdenes se basan en la dieta y remedios herbolarios ([http://www.iqb.es/d\\_mellitus/historia/historia01.html](http://www.iqb.es/d_mellitus/historia/historia01.html)).

### **I.2 Definición**

La diabetes mellitus (DM) se puede definir como un síndrome metabólico caracterizado por un estado de hiperglucemia crónica que se presenta debido a la ausencia o disminución en la secreción y/o acción de la insulina. Las consecuencias de la DM a largo plazo incluyen disfunción y falla en varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. En el desarrollo de la DM están involucrados varios procesos patogénicos, los cuales van desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina, hasta la generación de resistencia a la insulina. La base de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas es la acción deficiente de la insulina en los tejidos muscular, adiposo y hepático resultado de la inadecuada secreción o disminución en la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o más puntos de las vías de acción de esta hormona. El deterioro en la secreción de insulina y los defectos en su acción frecuentemente coexisten en el mismo paciente, sin embargo, se desconoce cuál es la primera causa de la hiperglucemia (Expert Committee, 2003a).

### I.3 Signos y síntomas

La DM presenta síntomas característicos tales como: sed intensa (polidipsia), micción frecuente y abundante (poliuria), pérdida de peso, algunas veces con gran apetito (polifagia), visión borrosa, náuseas, vómito, debilidad o cansancio excesivo, altas concentraciones de glucosa en sangre y en orina, incremento en la susceptibilidad a enfermedades e infecciones, tales como vaginitis, irritabilidad, apatía, impotencia (en hombres) y cetoacidosis (condición en la cual se acumulan cetonas en el torrente sanguíneo), como consecuencia de la utilización de ácidos grasos en lugar de glucosa, que resulta en el incremento de acidez en la sangre. La susceptibilidad a ciertas infecciones puede también acompañar a la hiperglucemia crónica (Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003a).

En forma más severa se puede desarrollar cetoacidosis, que puede llevar al paciente al estado de coma cuando éste no ha sido sometido a un tratamiento adecuado. Las repercusiones a largo plazo de la DM incluyen el desarrollo progresivo de complicaciones específicas; por ejemplo, las consecuencias vasculares de la diabetes consisten en anormalidades macrovasculares (macroangiopatía) y microvasculares (microangiopatía). Las anormalidades macrovasculares resultan en aterosclerosis, con incremento en enfermedades cerebrovasculares e infarto del miocardio. Las afecciones neuropatológicas afectan al sistema nervioso autónomo y a los nervios periféricos y, junto con la insuficiencia circulatoria aterosclerótica en las extremidades, puede producir ulceración crónica y gangrena, en particular en los pies (pie diabético). Las anormalidades microvasculares comprenden cicatrización proliferativa de la retina (retinopatía diabética) y enfermedad renal (nefropatía diabética). Las complicaciones microvasculares se explican en gran parte por la hiperglucemia crónica y algunas veces pueden prevenirse controlando esta última. Sin embargo, es menos probable que dicho control ayude en el caso de las anormalidades macrovasculares. Los pacientes con DM tienen alta incidencia de enfermedades ateroscleróticas cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares; frecuentemente hipertensión, alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas y enfermedades dentales. El impacto social y

emocional de la DM y la demanda de terapia efectiva, pueden provocar disfunción psicosocial en los pacientes y sus familiares (Edelstein y col., 1997; Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003a).

#### I.4 Clasificación

Se distinguen 4 tipos de diabetes mellitus (DM): tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos específicos entre los que se encuentran: defectos genéticos de las células  $\beta$ , defectos genéticos en la acción de la insulina y asociada a otros síndromes, tales como: Down, Klinefelter, Cushing y Turner (Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003a).

##### a. DM tipo 1 (DM1)

Antes conocida como DM dependiente de insulina (DMID) o diabetes juvenil, la DM1 implica destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, resultando en la absoluta deficiencia de insulina. Los marcadores de la destrucción inmune de las células  $\beta$  pancreáticas incluyen la presencia de autoanticuerpos a insulina, a descarboxilasa del ácido glutámico y a las fosfatasas de tirosina (IA-2 y IA-2 $\beta$ ). La incidencia de este tipo de diabetes es variable, presentándose principalmente en niños y en algunos adultos. Algunos pacientes, principalmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad. Otros, con una moderada hiperglucemia en ayuno que rápidamente cambia a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis en presencia de alguna infección o de estrés. Particularmente, los adultos mantienen de manera moderada la función de las células  $\beta$  pancreáticas, la cual resulta suficiente para prevenir la cetoacidosis durante algunos años. La mayoría de los pacientes con DM1 llegan a depender de la insulina, lo que indica la ausencia o disminución en la secreción de insulina. La destrucción autoinmune de las células pancreáticas  $\beta$  tiene múltiples predisposiciones genéticas que también están relacionados con factores ambientales. Aunque los pacientes con DM1 son en su mayoría delgados, la presencia de obesidad dificulta el diagnóstico. Estos pacientes son propensos a otros desórdenes autoinmunes, tales como: enfermedad de Graves o Addison, tiroiditis de Hashimoto y anemia (Expert Committee, 2003a).

## b. DM tipo 2 (DM2)

Antes conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNID) o diabetes de adultos. La DM2 se caracteriza por obesidad y resistencia a la insulina, más que por destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas. Los pacientes que padecen este tipo de diabetes regularmente no requieren el uso de insulina en su tratamiento. Los pacientes que no son obesos, de acuerdo al criterio de peso tradicional, tienen un alto porcentaje de grasa en la región abdominal de su cuerpo. La cetoacidosis raramente se presenta de manera espontánea en este tipo de diabetes, pero se encuentra habitualmente asociada con otras enfermedades como por ejemplo infecciones. Esta forma de diabetes regularmente no se diagnóstica rápido ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en sus etapas tempranas no alerta al paciente con los síntomas clásicos de la DM. Los pacientes con DM2, presentan aún células  $\beta$  pancreáticas funcionales, sin embargo, la insulina secretada es insuficiente para compensar los niveles de glucosa sanguínea después de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos o grasas. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes se incrementa con la edad, la obesidad y la ausencia de actividad física. Está frecuentemente asociada con una fuerte predisposición genética, a pesar de ello, la genética de esta forma de diabetes es aún poco clara (Expert Committee, 2003a).

La DM2 la padecen entre el 80 y el 95% de los pacientes con DM (WHO, 2003; Wild y col., 2004). Sin embargo, existen notables variaciones de acuerdo a raza, país, grupo socioeconómico y presencia de otras condiciones como obesidad, dislipidemia e hipertensión (King y col., 1998).

En este trabajo nos referiremos principalmente a la DM2, la cual es la más común y generalmente aparece en la edad adulta, es decir, después de los 40 años de edad (Expert Committee, 2003a).

Se estima que el 50% de los individuos con DM2 no han sido diagnosticados aún y el 20% de los pacientes que se diagnostican con DM2 presentan datos de complicaciones crónicas en el momento del diagnóstico. La DM2 es la enfermedad endocrina más frecuente y de las principales causas de mortalidad en la sociedad contemporánea; por sí misma es un problema de salud pública frecuente y creciente. En el ámbito mundial el



predominio de la DM2 se ha incrementado dramáticamente en los últimos años debido a la falta de actividad física, obesidad y cambios en los hábitos alimenticios (<http://www.who.int/diabetes/en/>; WHO, 2003).

La DM2 implica, por lo tanto, alteraciones en la secreción de insulina y en la resistencia a la acción de esta hormona. En estos procesos intervienen factores genéticos y ambientales. Al principio, las células  $\beta$  pancreáticas dejan de responder con incrementos adecuados en la secreción de insulina a los aumentos de la glucosa, después se produce elevación en la secreción de insulina, la cual se observa muy frecuentemente cuando existe la obesidad, exceso de consumo de grasas o inactividad física. En esta etapa intermedia el incremento en la secreción de insulina puede todavía ser suficiente, de tal suerte que la tolerancia a la glucosa se mantiene en límites normales, pero después progresa la deficiencia secretora de insulina y se genera resistencia a la insulina. Con el paso del tiempo, el deterioro en la secreción de insulina empeora la tolerancia a la glucosa, aumentando la producción hepática de glucosa muy por encima de su requerimiento y se presenta la hiperglucemia en ayunas. (Draznin, 1994; Committee Report, 1997).

#### c. DM gestacional (DMG)

Se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con reconocimiento durante el embarazo. La definición aplica sin tomar en cuenta si la administración de insulina o sólo la modificación en la dieta se usan para el tratamiento o si la condición persiste después del embarazo. Seis meses después del término del embarazo la paciente puede ser diagnosticada nuevamente en una de las siguientes categorías: 1) diabetes, 2) daño en la tolerancia a la glucosa (IGT del inglés *impaired glucose tolerance*), 3) daño en la glucosa en ayuno (IFG del inglés *impaired fasting glucose*), o 4) normoglucemia. Los términos IGT e IFG se refieren a etapas metabólicas intermedias entre la salud y la diabetes, ahora conocida como pre-diabetes. En la mayoría de los casos de DMG, el metabolismo de la glucosa llega a ser adecuado después del parto (Expert Committee, 2003a).

#### d. Otros tipos específicos

i) Defectos genéticos de las células  $\beta$  pancreáticas. La forma más común está asociada con mutaciones en el cromosoma 12 en un factor de

transcripción hepático (factor nuclear de hepatocitos HNF-1-alfa. Una segunda forma se encuentra asociada con mutaciones en el gen que codifica a la glucocinasa, en el cromosoma 7p y resulta en una molécula de glucocinasa ineficiente. La glucocinasa hepática es una enzima que convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato en la vía metabólica llamada glucólisis, que estimula la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas. De esta manera esta enzima sirve como un sensor de glucosa para las células  $\beta$  pancreáticas. Por lo tanto, el defecto en el gen de glucocinasa, incrementa los niveles de glucosa plasmática (Expert Committee, 2003a).

ii) Defectos genéticos en la acción de la insulina. En el pasado este síndrome era llamado resistencia a insulina tipo A. Las alteraciones metabólicas asociadas con mutaciones en el receptor de insulina abarcan desde hiperinsulinemia, hiperglucemia moderada hasta diabetes severa. Las mujeres, pueden llegar a virilizarse, ser grandes en estatura y presentar alteraciones en los ovarios. Las mutaciones en el receptor a insulina se han llegado a presentar en presencia de otros síndromes entre los que se encuentra: Leprechaunismo y Rabson-Mendenhall (Expert Committee, 2003a).

### 1.5 Factores de riesgo

Algunos de los factores de riesgo más comunes para la diabetes son:

- Historia familiar con antecedentes diabéticos (DM1, DM2),
- Historia familiar con enfermedades autoinmunes (DM1),
- Madre muy joven o anciana (DM1),
- Ser mayor de 40 años (DM2),
- Presentar acumulación de grasa en la región abdominal del cuerpo (DM2),
- Altos niveles de colesterol o triglicéridos en sangre (DM2) (Expert Committee, 2003a).

### 1.6 Diagnóstico

Existen diferentes tipos de pruebas para diagnosticar diabetes, entre las cuales se encuentran: la glucosa plasmática en ayuno (FPG del inglés *fasting plasme glucose*), prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT del

inglés *oral glucose tolerance test*), hemoglobina glucosilada (HbA<sub>1c</sub> o A<sub>1c</sub>). Sin embargo, estas pruebas presentan diferente sensibilidad, ventajas y desventajas. Por ejemplo la FPG es menos sensible que la OGTT, debido a que esta última fue diseñada especialmente para detectar anomalías en el metabolismo de la glucosa en pacientes con niveles normales de FPG. La OGTT ha llegado a ser conveniente para detectar alteraciones de los valores de glucosa sanguínea en pacientes que no han sido sometidos a ayuno. Esta prueba ha llegado a ser el “estándar de oro” de las pruebas para el diagnóstico de diabetes. Por su parte, la determinación de A<sub>1c</sub>, es capaz de indicar un estado crónico de hiperglucemia no siendo necesaria una condición de ayuno para la realización de la prueba, la muestra sanguínea puede ser tomada en cualquier momento del día, sin embargo este parámetro aunque es empleado como herramienta para la detección de altas concentraciones de glucosa en sangre no es recomendado para el diagnóstico de la diabetes (Expert Committee, 2003b).

Estas pruebas requieren una pequeña muestra sanguínea obtenida mediante el picar la yema de un dedo con una lanceta. La glucosa plasmática se determina usando tiras reactivas y un aparato para la determinación cuantitativa de la glucosa en sangre. Las tres maneras de emitir un diagnóstico positivo para diabetes son las siguientes:

- Síntomas diabéticos más concentración de glucosa plasmática  $\geq$  a 200 mg/dL (11.1 mmol/L),
- Glucosa plasmática en ayuno  $\geq$  126 mg/dL (7.0 mmol/L), el ayuno está definido como la ausencia de ingesta de calorías en un periodo mínimo de 8 horas,
- Presentar una concentración  $\geq$  a 200 mg/dL (11.1 mmol/L) durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa, después de dos horas de ingerir 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. No se recomienda realizar esta prueba en un estudio clínico rutinario (Expert Committee, 2003a).

### 1.7 Control de la DM

Los principales objetivos del control de la DM son: 1) mantener la concentración de glucosa en sangre, así como de lípidos y lipoproteínas, en rangos normales o cercanos a éstos (FPG < 110 mg/dL, OGTT < 140 mg/dL)

con el propósito de prevenir o reducir los riesgos de las complicaciones vasculares de la DM, 2) prevenir y tratar las complicaciones de la DM mediante la modificación de la dieta y ejercicio, 3) administración de insulina o antidiabéticos orales cuando la dieta o el ejercicio no son suficientes para reducir la glucemia. De esta manera, los pilares del tratamiento del diabético son: régimen dietético, ejercicio, educación del paciente y tratamiento farmacológico (Mayer, 1991; ADA, 2004).

#### a. Dieta

Con la dieta se propone mantener o disminuir el peso corporal de los pacientes en los límites fisiológicos. Para lograr esto, es necesario la ingesta de alimentos en pequeñas cantidades a lo largo de todo el día para no sobrepasar la capacidad metabólica de la insulina; es decir, la mínima cantidad de calorías por kilogramo de peso en relación con la actividad física del paciente, evitar el aumento en la ingestión de alimentos ricos en lípidos y proteínas, son preferibles los polisacáridos a los azúcares sencillos, debido a que los primeros deben ser divididos a azúcares más sencillos en el tracto gastrointestinal, y por tanto se produce el ascenso en la concentración de glucosa sanguínea de manera más lenta, reduciendo con ello el trabajo de las células  $\beta$  pancreáticas, por último, la dieta debe de estar relacionada con los hábitos del paciente (Goodman y Gilman, 1996; Moore y col., 2004; ADA, 2004).

#### b. Ejercicio

El ejercicio juega un papel muy importante en el control de la DM2, debido a que permite la disminución de la concentración de glucosa plasmática y ayuda a que la insulina trabaje de manera más eficiente, además a la disminución de peso corporal; el ejercicio, también incrementa la salud cardiovascular, mejorando la presión sanguínea y reduciendo el riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, a pesar de los beneficios de comenzar una rutina de ejercicios que se traduce en mejor salud, a la mayoría de las personas les resulta muy difícil establecer un programa de ejercicio durante un periodo prolongado, por lo que es necesario establecer estrategias para desarrollar rutinas de ejercicio que promuevan la regularidad de éste en los pacientes.

### c. Tratamientos farmacológicos

#### i) Insulina

La insulina es liberada por de las células  $\beta$  pancreáticas de los islotes de Langerhans en respuesta a diversos estímulos, tales como altas concentraciones del trifosfato de adenosina (ATP), glucosa, manosa, leucina y arginina (Katzung, 1999). De manera particular, la liberación de insulina estimulada por glucosa es resultado de un estado de hiperglucemia que incrementa los valores intracelulares de ATP, que provoca el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). La disminución de la corriente saliente de potasio, a través de este conducto, origina la despolarización de las células  $\beta$  y la apertura de los conductos de calcio sensibles a cambios de voltaje. El aumento de calcio intracelular que se presenta desencadena la secreción de la insulina (Doyle y Egan, 2003) para que ésta se una a los receptores de membrana de sus tres órganos blanco (músculo, adipositos y hepatocitos) con el objetivo de introducir la glucosa a las células y, en caso de que haya exceso, almacenarla en forma de glucógeno. Al unirse la insulina a receptores membranales en hepatocitos, provoca el incremento de la actividad de la glucógeno sintetasa mientras que su unión a receptores de membrana en adipocitos y células musculares provoca la exocitosis y activación de los transportadores de glucosa, aumentando la captación de glucosa (Katzung, 1999; Su y Lee, 1994; Silberberg y Van Breemen., 1991; Shieh y col., 1996; Lodish y col., 2002; Procks y col., 2002).

Todos los pacientes con DM1 pueden emplear insulina para controlar la concentración de glucosa sanguínea, una pequeña cantidad de los pacientes con DM2 también emplean la insulina, la cual es inyectada por vía subcutánea y se absorbe rápidamente. Existen varios tipos de insulina disponibles comercialmente y pueden ser clasificados de acuerdo a la velocidad con la que ejercen su acción. Los tipos más comunes de insulina son los siguientes: a) insulina de acción ultrabreve: cuando la insulina lispro se inyecta por vía subcutánea, se absorbe rápidamente logrando concentraciones séricas máximas en una hora. El tiempo óptimo de la aplicación preprandial de este tipo de insulina es de 20 a 60 minutos, en pacientes con DM1 que reciben terapia intensa de insulina; b) insulina de

acción breve: la insulina regular está asociada al ión metálico zinc, es cristalina, soluble, de acción breve y sus efectos son evidentes 30 minutos después de la inyección subcutánea. Es particularmente útil para el tratamiento intravenoso en el manejo de la cetoacidosis diabética y cuando los requerimientos de insulina cambian rápidamente, como después de una cirugía o durante infecciones agudas; c) insulinas de acción intermedia y de acción prolongada: estos tipos de insulina, al administrarse en forma subcutánea se absorben rápidamente con acción prolongada, alcanzando sus valores máximos plasmáticos entre la primera y tercera hora después de la aplicación (Katzung, 1999).

## ii) Agentes hipoglucemiantes orales (AHO)

Entre los AHO más usados se encuentran las biguanidas, los inhibidores de alfa-glucosidasas, los derivados de las tiazolidinedionas y las sulfonilureas (SU).

### ❖ Biguanidas

Hace más de 30 años varias biguanidas (metformina, fenformina y buformina) se usaban en el control de la DM, sin embargo, en los Estados Unidos de Norteamérica fueron retiradas del mercado en 1970 debido a que se les asoció con acidosis láctica y no fue sino hasta 1995 que se aprobó su uso (Katzung, 1999).

#### • Eficacia y uso clínico

La metformina parece tener efectos benéficos en el control glucémico debido a que está asociada a pérdida de peso. El perfil de lípidos de pacientes diabéticos tratados con metformina, muestra disminución de los valores plasmáticos de ácidos grasos, triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad, estos resultados se reflejan en un efecto cardiovascular benéfico. La metformina puede ser empleada en el control de la diabetes como monoterapia, en combinación con otros AHO o con la insulina. Es recomendada como terapia primaria en el caso de pacientes DM2 con exceso de peso. La dosis inicial es de 500 mg por día que se va incrementando hasta una dosis máxima de 1000 mg dos veces al día (Katzung, 1999; Cheng y Fantus, 2005).

- Efectos secundarios y contraindicaciones

Los efectos secundarios gastrointestinales observados en los pacientes con DM2, dependiendo de la dosis, son: dolor abdominal, anorexia, diarrea, edema generalizado (retención de líquidos). Estos efectos secundarios regularmente se atenúan con el uso continuo a dosis pequeñas (250-500 mg/día), dicha dosis debe de incrementarse muy lentamente. Cuando la secreción de insulina no ha sido alterada, no se presenta hipoglucemia con el uso de metformina. Su uso no se ha relacionado con acidosis láctica. La metformina puede ser empleada con extrema precaución y en dosis pequeñas en pacientes con disfunción renal moderada (Katzung, 1999; Cheng y Fantus, 2005).

- Mecanismo de acción

Las biguanidas ejercen acciones extrapancreáticas, su principal mecanismo de acción es aumentando la sensibilidad a la insulina en tejido hepático y periférico (principalmente en músculo), en el primero disminuyendo de la glucogenólisis (liberación hepática de glucosa) y de la gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de otros sustratos como aminoácidos o glicerol) y en el segundo directa e indirectamente (por disminución del efecto tóxico de la hiperglucemia). La metformina no tiene efecto directo sobre las células beta. La metformina activa la protein cinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK) hepática y muscular. La activación hepática de AMPK resulta en la fosforilación e inhibición de la acetil-CoA carboxilasa, la cual cataliza un paso limitante en la lipogénesis. Este bloqueo en la síntesis de los ácidos grasos, promueve la oxidación de los ácidos grasos. En general, la activación de AMPK hepática disminuye la expresión de SREBP-1 (del inglés sterol-regulatory-element-binding-protein-1), factor de transcripción implicado en la patogénesis de la resistencia a la insulina y diabetes. La disminución de la expresión de SREBP-1, resulta en el decremento de la expresión de enzimas lipogénicas, las cuales además contribuyen a la disminución en la síntesis de triglicéridos. La activación de AMPK es esencial en la disminución de la producción de la glucosa hepática y el incremento en el consumo de glucosa por parte del músculo esquelético. De esta manera, AMPK es el principal regulador en el metabolismo de lípidos y glucosa y puede ser un mediador clave de los efectos de la

metformina. Otros efectos tales como el incremento en la expresión de hexocinasa muscular y el transportador de glucosa sensible a insulina, parecen ser fenómenos secundarios. Es excretada sin modificar por los riñones (Zhou y col., 2001; Zou y col., 2004; Cheng y Fantus, 2005).

#### ❖ Inhibidores de alfa las glucosidasas

Los inhibidores de alfa glucosidasas disponibles en México, Canadá y Estados Unidos, son la acarbosa y el miglitol (Katzung, 1999).

##### • Eficacia y uso clínico

La disminución de las concentraciones de glucosa sanguínea es menor comparado con otros AHO, siendo menos eficaz. Se ha demostrado una pequeña disminución en los valores de triglicéridos, son poco usados como monoterapia y no son recomendados para la hiperglucemia moderada o severa inicial ( $A_{1C} \geq 9.0\%$ ), sin embargo, son muy útiles en combinación con otros AHO. La dosis inicial es de 25 mg/día y se va incrementando hasta tolerar 100 mg tres veces al día. La dosis límite de tolerancia para los efectos secundarios gastrointestinales es de 50 mg (Cheng y Fantus, 2005).

##### • Efectos secundarios y contraindicaciones

Los principales efectos secundarios de estos AHO son gastrointestinales. Específicamente, distensión y dolor abdominal, diarrea y flatulencias. Sin embargo, si se inicia el tratamiento con la dosis mínima y se va incrementando paulatinamente, los efectos secundarios disminuyen. Con el uso de este tipo de agentes hipoglucemiantes orales no se presentan casos de hipoglucemia, sin embargo, están contraindicados en pacientes con colón irritable o disfunción severa en riñones o hígado (Marcy y col., 2004; Cheng y Fantus, 2005).

##### • Mecanismo de acción

Esta clase de AHO inhibe en forma competitiva las enzimas intestinales responsables de la absorción de oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) presentes en las vellosidades intestinales, retardando el metabolismo (catabolismo) de los carbohidratos reduciendo de los picos glucémicos postprandiales. También actúan disminuyendo la secreción de polipéptidos intestinales (Marcy y col., 2004).



#### ❖ Derivados de la tiazolidinedionas

En este tipo de AHO se encuentran las glitazonas ciglitazona, englitazona, pioglitazona, troglitazona y rosiglitazona (Katzung, 1999; Flores Saénz y col., 2003).

- Eficacia y uso clínico

La eficacia de troglitazona durante un periodo de hasta 12 semanas, induce una disminución de la resistencia a la insulina, disminuye la insulinemia y mejora la hiperglucemia, tanto en ayuno como posprandial, en pacientes con DM2 (Katzung, 1999).

- Efectos secundarios y contraindicaciones

Estudios realizados con estos hipoglucemiantes han mostrado que pueden provocar hepatotoxicidad, con niveles anormales de alanina, aminotransferasas, fosfatasa alcalina y bilirrubina (Marcy y col., 2004).

- Mecanismo de acción

Son agonistas del receptor de proliferación peroxisomal gama (PPAR-gamma del inglés peroxisome proliferator-activated receptor gamma), reduciendo con ello la resistencia a la insulina, fundamentalmente a nivel de tejidos periféricos (tejido graso y muscular), aunque también tienen un cierto efecto sobre el tejido hepático (inhibiendo la gluconeogénesis hepática) (Marcy y col., 2004).

En esta investigación, se abordan a continuación de manera más detallada las SU debido a que en la actualidad constituyen el medio de control más empleado por los pacientes con DM2.

#### ❖ Sulfonilureas

Las SU son los AHO más empleados en la actualidad para el tratamiento de la DM2. La tolbutamida y la cloropropamida, pertenecen a la primera generación, mientras que, la glibenclamida, glipicida y glimepirida, pertenecen a la segunda generación (Katzung, 1999).

- Estructura química

Los principales fármacos orales disponibles para el tratamiento de la hiperglucemia en pacientes con DM2 son las SU. Se caracterizan por la presencia de 1 ó 2 grupos bencénicos y un residuo nitrogenado de la fracción urea. En el caso de tolbutamida y tolazamida, el único grupo bencénico presenta en la posición para ( $p^-$ ) los sustituyentes  $CH_3$  y  $SO_2$  a

diferencia de la cloropropamida y acetohexamida que presentan  $\text{Cl}^-$  y  $\text{SO}_2$  ó  $\text{CH}_3\text{-C=O}$  y  $\text{SO}_2$ , respectivamente. La glicipida, al igual que la glibenclamida, posee dos grupos bencénicos cuyos sustituyentes en la posición p<sup>-</sup> son  $\text{C H}_3$  y  $\text{C=O}$  ó  $\text{Cl}^-$  y  $\text{O CH}_3$ , respectivamente (Figura 1) (Katzung, 1999).

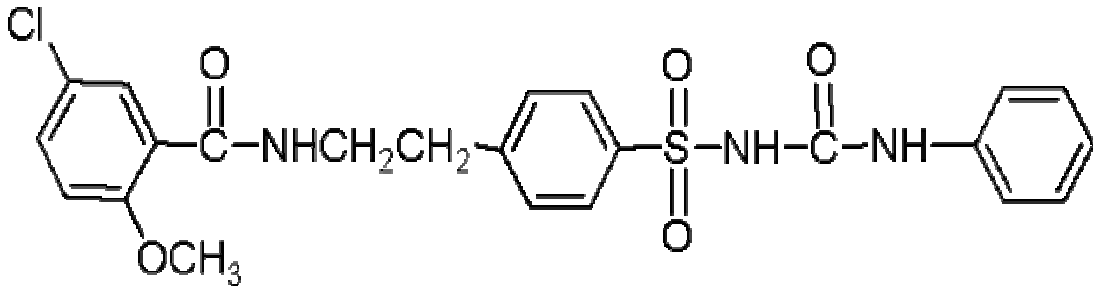


Figura 1. Estructura química de la glibenclamida.

- Eficacia y uso clínico

En general es mejor comenzar con una dosis baja e incrementarla gradualmente durante una o dos semanas hasta alcanzar concentraciones de glucosa en sangre < 110 mg/dL, que representan un estado saludable y evitar la hipoglucemia, particularmente en pacientes de edad avanzada. La dosis de administración de la glimepirida es de 1, 2 ó 4 mg una vez al día, en el caso de la glibenclamida, la dosis es de 2.5 mg dos veces al día. Las SU se absorben en el tracto gastrointestinal. En el plasma 90 a 99% de ellas se encuentran unidas a proteínas, especialmente albúmina. Son metabolizadas en el hígado y eliminadas en la orina. En función del tiempo necesario para alcanzar una concentración óptima en el plasma, la mayoría de las SU son más efectivas cuando se administran media hora antes de la comida (Contreras y col., 2002b; Cheng y Fantus, 2005).

- Efectos secundarios y contraindicaciones

El principal efecto secundario de las SU son hipoglucemia y ganancia de peso corporal. Debido a que las SU estimulan directamente la secreción de las células  $\beta$  pancreáticas de forma independiente de los niveles de glucosa plasmática, el riesgo de presentar hipoglucemia también se asocia con todas las SU. No se recomienda su uso en pacientes con alergia a las sulfonamidas (Cheng y Fantus, 2005).

- Mecanismo de acción

Se conocen al menos tres mecanismos de acción de las SU: a) liberación de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas, b) reducción de las concentraciones séricas de glucagon y c) efecto extrapancreático para potenciar la acción de la insulina en los tejidos blanco (Kaku y col., 1995; Katzung, 1999; Procks y col., 2002).

El primer mecanismo se considera el más importante y se lleva a cabo por la unión de las SU a su respectivo receptor (SUR). Estos agentes ejercen su acción hipoglucemiante al bloquear los canales  $K_{ATP}$  en las células  $\beta$  pancreáticas (Contreras y col., 2002b). Así, su acción se inicia tras la unión al receptor SUR, subunidad de los canales  $K_{ATP}$ , provocando el bloqueo de estos últimos (Mudaliar y Henry, 1999; Litter, 1998; Procks y col., 2002; Fonseca y col., 2004; Hamaguchi y col., 2004). A través de este mecanismo se ha demostrado que las SU provocan aumento en la secreción de insulina, lo que resulta en la disminución del requerimiento de insulina exógena, sin disminución las concentraciones de triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad y colesterol (Stuart y col., 1997).

Cabe señalar que los canales de  $K_{ATP}$  se localizan también en las membranas plasmáticas de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos (Goodman y Gilman, 1996; Litter, 1998; Katzung, 1999; Brayden, 2002; Procks y col., 2002; Cyrino y col., 2003), lo que ha permitido emplear estos tejidos como modelos experimentales *in vitro* en la investigación y descubrimiento de nuevos compuestos hipoglucemiantes bloqueadores de los canales de  $K_{ATP}$  (Jones y col., 1997).

- Canales  $K_{ATP}$

- Estructura

Los canales  $K_{ATP}$  son heterodímeros compuestos por dos diferentes subunidades SUR (receptor de SU) y Kir (rectificador interno de potasio), ambas subunidades se ensamblan para formar un poro (Figura 2) (Nagashima y col., 2004).

- Localización y función fisiológica

Los canales  $K_{ATP}$  se encuentran en varios tejidos musculares, incluyendo músculo liso vascular, músculo cardíaco y músculo esquelético, así como en algunas neuronas del sistema nervioso central. En todos estos

tejidos los canales  $K_{ATP}$  responden de igual forma a las SU y a concentraciones altas de ATP, contribuyendo al tono del músculo liso vascular y en consecuencia a la presión sanguínea, estos canales también están involucrados en la respuesta de isquemia cerebral y cardiaca. En las células  $\beta$  pancreáticas los canales  $K_{ATP}$  juegan un papel muy importante en la regulación de la secreción de insulina inducida por SU. (Liss y Roeper, 2001; Brayden, 2002, Procks y col., 2002; Nakaya y col., 2003).

Tanto SUR como Kir se asocian de manera específica de acuerdo al tejido en donde se localizan (Tabla 1). Sin embargo, se ha observado que la glibenclamida bloquea los canales que poseen SUR tipo 1 y 2, también se ha demostrado que el incremento en la concentración de ATP incrementa la eficacia de la glibenclamida para bloquear los canales que posean SUR1 (Proks y col., 2002), esto se puede explicar en parte debido a que esta subunidad se pueden unir dos moléculas de glibenclamida, a diferencia de las otras SU tales como tolbutamida, cloropropamida, acetohexamida, tolazamida, que pueden unirse a un solo sitio de unión (Ashfield y col., 1999).

Tabla 1. Canales  $K_{ATP}$  específico para cada tipo de tejido.

Tipo de canal $K_{ATP}$	Subunidad Kir	Subunidad SUR
Células $\beta$ -pancreáticas	6.2	1
Músculo cardíaco y esquelético	6.2	2A
Músculo liso	6.2	2B
Músculo liso vascular	6.1	2B

Coppack y col., 1990; Clement y col., 1997; Nagashima y col., 2004.

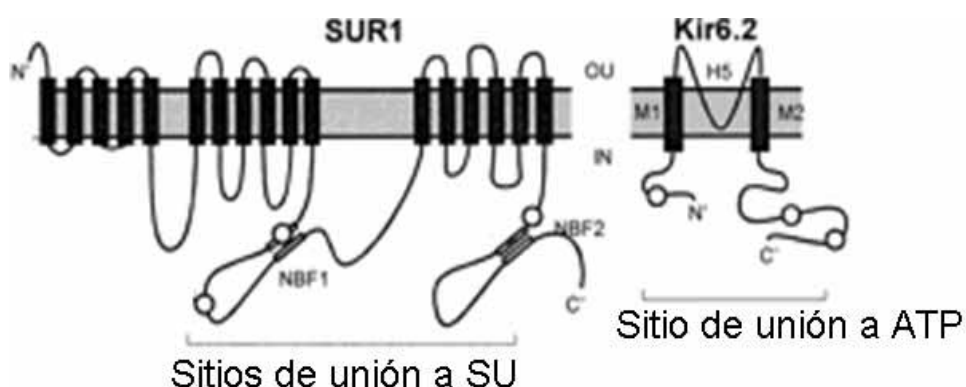


Figura 2. Topología del receptor SUR1 y la subunidad Kir 6.2. La hidrólisis de nucleótidos en SUR1 en los NBF o la unión de MgADP contrarresta el efecto inhibitorio del ATP (Nichols y Koster, 2002).

En las células  $\beta$  pancreáticas, Kir 6.2 no puede formar por sí sola el canal funcional, necesita la presencia de Sur1, de esta manera la subunidad SUR funciona como chaperona de la subunidad Kir 6.2. Cuando la relación ATP/ADP es baja, el ATP se une a NBF1 (del inglés nucleotide binding folds) y el ADP a NBF2 de SUR1. La relación entre Kir 6.2 y SUR1 en esta conformación es tal que el canal está abierto y el ATP no se une a Kir 6.2. Al unirse las SU a SUR, en las células  $\beta$  pancreáticas, se induce un cambio conformacional en el receptor, inhibiendo la salida de potasio de la célula, que resulta en la despolarización de la membrana celular, provocando la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje. El aumento en la concentración de calcio en la célula produce la exocitosis de los gránulos secretores de insulina hacia la membrana plasmática y la liberación de dicha hormona (Su y Lee, 1994; Ashfield y col., 1999; Ashcroft y Gribble, 2000; Nichols y Koster, 2002, Procks y col., 2002; Cheng y Fantus, 2005).

La glibenclamida es la SU más potente utilizada hasta ahora como bloqueadora de los canales  $K_{ATP}$ . Su acción provoca el cierre de los canales de potasio y la apertura automática de los canales de calcio. El incremento de la concentración citoplasmática de calcio es el responsable de la liberación de insulina (Shieh y col., 1996; Katzung, 1999; Procks y col., 2002).

Debido a que la glibenclamida, actúa a través de canales de potasio en la membrana de las células  $\beta$  del páncreas, los estudios *in vitro* para analizar sustancias con actividad hipoglucemiante cuyo mecanismo de acción sea similar al de las SU, se pueden realizar en el músculo liso vascular el cual posee canales de  $K_{ATP}$ , utilizando conjuntamente activadores de estos canales, como el diazóxido.

- Mecanismo de acción del diazóxido

Se basa en la activación de los canales de  $K_{ATP}$ , lo que evita su cierre (efecto opuesto a las SU), por lo que se presenta una inhibición en la secreción de insulina, pero no un bloqueo de su síntesis y, al nivel del receptor de la insulina en los órganos diana que poseen  $K_{ATP}$ , inhibe la utilización periférica de la glucosa. En preparaciones de anillos aislados de aorta de rata el diazóxido muestra un antagonismo no competitivo con

sustancias similares a la noradrenalina, como la fenilefrina (Trube y col., 1986; Quast y Cook, 1989., Jones y col., 1997; Litter, 1998., Cyrino y col., 2003).

o Acción de la fenilefrina y activación de los receptores alfa adrenérgicos

Por su parte, la fenilefrina es un agonista de los receptores alfa adrenérgicos y por no ser un derivado del catecol no es inactivado por la catecol-O-metil transferasa (COMT), enzima que convierte el grupo OH<sup>-</sup> en OCH<sub>3</sub>, su tiempo de acción es mucho más prolongado que las catecolaminas (Lodish y col., 2002).

Los receptores alfa adrenérgicos, al interaccionar con la fenilefrina, cambian su conformación y son capaces de acoplarse a proteínas G<sub>q</sub> o G<sub>i</sub>, respectivamente. Al acoplarse a G<sub>i</sub> inhiben a la adenilato ciclasa mientras que, al acoplarse a G<sub>q</sub> se estimula la fosfolipasa C que a su vez genera inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El DAG, por ser una molécula lipofílica permanece en la membrana, mientras que el IP<sub>3</sub> es capaz de difundir hacia el citosol y unirse a canales de calcio sensibles a IP<sub>3</sub> en el retículo endoplasmático, su unión induce la apertura del canal lo que permite la salida de calcio hacia el citosol. El calcio liberado puede seguir dos caminos y provocar la migración de la protein cinasa C hacia la membrana para ser activada por DAG y entonces fosforilar diversas enzimas y receptores celulares; o bien, unirse a la calmodulina, en general a cada molécula de calmodulina se unen 4 iones calcio, lo que provoca un cambio en la conformación de ésta, permitiendo su unión a muchas enzimas tales como la cadena ligera de miosina, estimulando así la vasoconstricción (Lodish y col., 2002).

Por otro lado, aunque todos los hipoglucemiantes orales se emplean normalmente en el control de la DM2, con frecuencia se relacionan con efectos adversos importantes, como son: insuficiencia para responder de manera adecuada al tratamiento (tolerancia), coma diabético, acetonuria persistente, descompensación acidótica y toxicidad fetal, entre otras. Por su parte, el tratamiento con insulina presenta ciertas complicaciones como: hipoglucemia, trastornos inmunitarios (alergia y/o resistencia inmunitaria a la insulina). También la vía de administración representa graves inconvenientes, ya que debido a las repetidas aplicaciones de inyecciones

llegan a presentarse complicaciones, como irritación local y lipodistrofia en los sitios de inyección (Katzung, 1999). Cabe señalar que todos estos problemas con los fármacos hipoglucemiantes existentes hasta ahora, nos ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la DM, entre las que se encuentran las plantas medicinales.

#### d. Plantas medicinales

En México el uso de plantas medicinales tiene un gran precedente histórico, mientras que en los Estados Unidos el 20% de los sujetos diabéticos emplean la medicina herbal. En México, la planta más empleada por los pacientes con DM2 (73.1% de ellos) es el nopal (*Opuntia streptacantha*)(Argáez-López y col., 2003).

En investigaciones etnobotánicas recientes se reporta la existencia de más de 300 plantas usadas en México como antidiabéticas (Hernández y col., 2002a; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Entre las familias botánicas más estudiadas científicamente en relación a su efecto hipoglucemiante se encuentran: Apocynaceae, Cucurbitaceae, Plantaginaceae y Asteraceae. Pertenecientes a estas familias se encuentran: *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum*.

#### i) ***Catharanthus roseus***

Familia: Apocynaceae

Nombre científico: *Catharanthus roseus*

Nombre común: Teresita, maravilla



#### ❖ Descripción botánica

Arbusto que tiene hojas durante todo el año (perennifolio) de hasta 60 cm de altura, con numerosas ramas erectas. Hojas opuestas, pecioladas,

con una lámina elíptica (hasta 7 x 4 cm), redondeado en la base y en el ápice. Las hojas son ligeramente vellosas (pubescentes), con nervios secundarios que se arquean hacia el ápice. Flores cortamente pedunculadas (prolongaciones del cuerpo de la planta que lo une al suelo), solitarias o en parejas. La corola está formada por cinco pétalos unidos. Florece durante el verano.

❖ Distribución geográfica

Quintana Roo, Nayarit, Yucatán y Puebla.

❖ Componentes químicos

Catarantina, sulfato de leurosina, lochnerina, tetrahidroalstoina, vindolina y vindolinina, han sido asociadas al efecto hipoglucémico de la plantas. Por su parte, vinblastina y vincristina, poseen propiedades anticancerígenas y la reserpina, la cual tiene efecto antipsicolítico y antihipertensivo.

❖ Uso medicinal

La infusión de hojas, flores y ramas se emplea para: picaduras de avispa, hemorragias, astringente, diurético, tos, congestión pulmonar e inflamación, dolor de garganta, infecciones oculares y diabetes (<http://www.biotech.icmb.utexas.edu/botany/perihist.vc.shu/es/plfarm/46.caro.html> consultada Nov, 2005).

ii) ***Cucurbita ficifolia***

Familia: Cucurbitaceae

Nombre científico: *Cucurbita ficifolia* Bouche

Nombre común: Calabaza de hoja de higo (Estados Unidos), calabaza del malabar, sidra (Nahuatl), chilacayote (México y Guatemala), lacayote (Perú, Bolivia y Argentina), chiverri (Honduras y Costa Rica), victoria (Colombia).





❖ Descripción botánica

Planta perenne, resistente a las temperaturas extremas, excepto a la nieve. Ligeramente pubescente. Tiene cinco tallos angulares y hojas pecioladas. Con o sin manchas blancas en la superficie verde. Las flores masculinas son largas con un cáliz en forma de campana de 5-10 mm de largo y aproximadamente 5-15 mm de ancho, sépalos lineales y corola tubular en forma de campana, la cual es más ancha en la base de 6-12 cm. Las flores femeninas tienen pedúnculos fuertes de 3-5 cm de largo, sépalos ocasionalmente foliáceos y una corola poco más grande que las flores masculinas. Fruta globosa, cuya forma va de ovoide a elíptica, el color va de verde claro a verde oscuro, con o sin líneas blancas longitudinales o rayas hacia el ápice, el endocarpio es dulce y las semillas son ovaladas de 7-12 mm de color castaño oscuro a negro.

❖ Distribución geográfica

Estado de México, Puebla y Chiapas (cosmopolita).

❖ Componentes químicos

Desconocidos

❖ Uso medicinal

Se emplea comúnmente en los platillos de la cocina mexicana, o como dulce. La infusión de las semillas se emplea para el control de la diabetes (<http://www.fao.org/docrep/T0646EOa.html> consultada Nov, 05).

iii) ***Ibervillea sonorae***

Familia: Cucurbitaceae

Nombre científico: *Ibervillea sonorae* Green

Nombre común: guareque, wereque, wareki, choya-huami.



❖ Descripción botánica

Adaptada a sobrevivir en ambientes áridos, posee tallos inflados, llamados acudes, que son los que se encargan de almacenar las reservas de agua y nutrientes. Puede permanecer inactiva durante muchos años, pero en épocas de lluvias las hojas surgen del acudes en los tallos superiores. Posee una raíz grande que se proyecta hacia la tierra, el cáliz tiene tres líneas cilíndricas. Ligeramente pubescente. Las flores ligeramente pedunculadas. Las semillas están cubiertas con una pulpa de color rojo, con excepción del margen que puede ser liso u oblongo.

❖ Distribución geográfica

Culiacán, Chihuahua, Nuevo León, Sinaloa y Sonora.

❖ Componentes químicos

Desconocidos

❖ Uso medicinal

La infusión de las raíces se emplea para el control de la diabetes (<http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/wereque.pdf> consultada Nov, 2005).

iv) ***Plantago major***

Familia: Plantaginaceae

Nombre científico: *Plantago major* L.

Nombres comunes: Llantai, llantén macho, llantén mayor, tanchagem (portugués).



#### ❖ Descripción botánica

Planta herbácea, perenne, de porte pequeño, hasta 40 cm de altura. Hojas anchas, ovales o ligeramente lanceoladas, irregularmente dentadas en sus regiones basales, de color verde claro. Flores pequeñas, hermafroditas, agrupadas en espigas de hasta 6 a 25 cm, de color verde-amarillento, de 2 mm de largo. Fruto cápsula elipsoide de 2 a 4 mm de largo. Semillas muy pequeñas, redondas o fusiformes, de color verde oscuro y raíz fasciculada (<http://www.medicineatyourfeet.com/plantagomajor.html> consultada Nov, 2005).

#### ❖ Distribución geográfica

Distribuida en Durango, Veracruz y Yucatán.

#### ❖ Componentes químicos

Monoterpenos (catalpol, geniposio, aucubina, asperulósido, metiltósido, enzimas (invertina y emulsina), taninos, flavonoides, vitaminas A y C, ácidos orgánicos (vanílico, fumárico, sirúrgico, P-hidroxibenzoico, ferúlico, genticico, salicílico, P-cumárico, benzoico y cinámico), pectina (plantaglúsido), alcaloide (plantagonina), politerpenos, lignanos, benzenoides, lípidos, esteroides, quinoides y heterósidos cromogénicos (Samuelsen, 2000).

#### ❖ Uso medicinal

Antiséptico bucal, antiséptico dérmico, astringente, expectorante, hemostático, asma, bronquitis, conjuntivitis, dermatitis, hepatitis, diabetes mellitus, tos, vómito (Samuelsen, 2000).

#### v) ***Psacalium peltatum***

Familia: Compositae

Nombre científico: *Psacalium peltatum* (HBK) Cass

Nombre común: Chongo de huare, Tipejtsikua nanakeri (purépecha), matarique.



#### ❖ Descripción botánica

Planta herbácea perenne de 30 cm a 1.6 m de altura. Los tallos son casi leñosos, densamente pilosos en la base, pelos café. Las hojas basales son simples, alternas en roseta, de hasta 40 cm de largo, con el margen profundamente lobado, base peltada (de lámina redondeada y con el pecíolo inserto en el centro), con pecíolo largo. Las hojas subpeltadas (redondeadas), más pequeñas que las basales. La inflorescencia (forma en la que se encuentran las flores) posee de 10 a 24 flores, con prolongaciones de hasta 2 cm de largo, hojas que nacen de las prolongaciones (brácteas) pilosas y receptáculo plano. Las flores son hermafroditas, corola simpétala (pétalos unidos a una única rama), de color crema a café, estambres 5, ovario ínfero (que se desarrolla por debajo del cáliz). Los aquenios (fruto seco, cuyo pericarpio no se abre naturalmente para que salga su única semilla y no se encuentra unido a ella) son elipsoides, de 3 a 6 mm de largo. Posee un rizoma fibroso grueso.

#### ❖ Distribución geográfica

Estado de México, Jalisco, Puebla, Michoacán y Durango. Crece en bosques de pino-encino, entre los 205 a 1950 m del nivel del mar (<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/PsacaliumPeltatum.html> consultada Nov, 2005).

#### ❖ Componentes químicos

Se han descrito los componentes contenidos en las raíces de una especie de esta familia (*P. decompositae*): cacalol, cacalona, maturina, maturinona, maturona, maturinina (Romo del Vivar, 1985).

#### ❖ Uso medicinal

El té de la raíz se emplea para el control de la diabetes y dolores reumáticos (<http://www.semarnat.gob.mx.pfnm/PsacaliumPeltatum.html> consultada Nov, 2005).

#### I.8 Acción de la aloxana en la inducción de diabetes experimental

La aloxana es un agente diabetogénico que ejerce su acción al ser administrado parenteralmente, el cual provoca la destrucción masiva de las células beta de los islotes de Langerhans, que resulta en la reducción de la síntesis de insulina. Esta acción se ejerce a través de la formación de especies reactivas de oxígeno, así como su reducción a ácido dialúrico estableciendo un ciclo redox con la formación de radicales superóxido, los cuales pueden llegar a formar peróxido de hidrógeno, reacción que puede ocurrir espontáneamente en presencia de  $2H^+$  o ser catalizada por la superóxido dismutasa.

Uno de los principales blancos de las especies reactivas de oxígeno es el ADN de los islotes pancreáticos. Su fragmentación tienen lugar en las células  $\beta$  pancreáticas expuestas a la aloxana y limita el proceso de reparación del ADN, hecho que resulta en la destrucción de éstas células. La aloxana también puede reaccionar con los dos grupos SH de la glucocinasa, (enzima clave que participa en la glucólisis) en el sitio de unión a glucosa, que resulta en la formación de un enlace disulfuro y en consecuencia la inactivación de la enzima, por lo tanto no se lleva a cabo la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, impidiendo de esta manera la utilización de glucosa para la producción de energía. (Szkudelski., 2001).

## II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha estudiado el efecto hipoglucémico de diversos extractos orgánicos y acuosos de hojas, flores, frutos, tallos y/o raíces de las plantas mencionadas anteriormente. La Tabla 2 muestra los extractos, obtenidos de estas plantas, que mostraron mayor actividad hipoglucemiante *in vivo*, señalando los diferentes modelos experimentales en que han sido evaluados.

Tabla 2. Extractos vegetales con mayor actividad hipoglucemiante *in vivo*.

Nombre científico y número de herbario IMSSM	Nombre popular	Parte de la planta estudiada	Extractos activo	Modelos experimentales	Referencias
<i>Catharanthus roseus</i> Linn.	Maravilla, teresita	Flor, hojas, tallos y raíces	Acuoso	Conejos y ratones sanos y con diabetes inducida con aloxana.	Chattopadhyay., 1999, Singh y col., 2001; Srinivas y col., 2003.
<i>Cucurbita ficifolia</i> Bouche 11,119 y 13520	Chilacayote	Frutos	Acuoso	Conejos, ratones y ratas sanos y con diabetes moderada y severa. Pacientes con DM2.	Acosta y col., 2001; Alarcón y col., 2002b; Hernández y col., 2002a y b; Román y col., 1992.
<i>Ibervillea sonora</i> Greene 14,184	Wereque	Raíz	Diclorometánico	Ratones y ratas sanos con diabetes moderada y severa.	Alarcón y col., 2002a.
<i>Plantago major</i> Linnaeus	Llantén	Semillas	Hexánico y diclorometánico	Ratones sanos y con diabetes inducida con aloxana.	Hernández y col., 2002a.
<i>Psacalium peltatum</i> H.B.K. (Cass) 11490	Matarique	Raíces y rizomas	Acuoso	Conejos y ratones sanos y con diabetes moderada y severa. Pacientes diabéticos.	Alarcón y col., 1997; Alarcón y col., 2002c; Contreras y col., 2002a; Hernández y col., 2002a.

Singh y col. (2001) demostraron que tanto el extracto diclorometánico como el acuoso de hojas y ramas de *Catharanthus roseus*, al ser administrados a ratas sanas y diabéticas provocan disminución en la glucosa sanguínea. Por su parte, el jugo del fruto inmaduro de *Cucurbita ficifolia* administrado en pacientes con DM2 disminuye la concentración de glucosa en sangre (Acosta y col., 2001); así mismo, los estudios realizados por Román y col., (1992), así como por Hernández y col. (2002b) y Alarcón y col. (2002b) en modelos animales con diabetes experimental han demostrado que el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* tiene efecto hipoglucémico por vía oral e intraperitoneal en conejos y ratones, sanos y diabéticos. Sin embargo, cuando la planta se administró a animales severamente diabéticos no fue posible observar descensos significativos en la concentración de

glucosa sanguínea. Por otro lado, en otros estudios realizados por Román y col. (1992) se logró demostrar que el extracto acuoso de *Psacalium peltatum* reduce la concentración de glucosa sanguínea de conejos con hiperglucemia temporal y conejos con diabetes moderada (similar a la DM2), pero no en conejos con diabetes severa (similar a la DM1); además, Contreras y col. (2002a) lograron corroborar estos resultados en ratones con diabetes inducida por aloxana. Resultados similares se han encontrado en *Ibervillea sonora* y *Plantago major* en ratas y ratones con diabetes moderada y severa (Alarcón y col., 1997, Chattopadhyay y col., 1999, Alarcón y col., 2002a y c, Srinivas y col., 2003). Tomando en cuenta que los extractos hipoglucemiantes obtenidos de estas plantas sólo son activos en modelos animales con células beta funcionales, es probable que su mecanismo de acción sea similar al de las SU. Es decir, que ejerzan su acción hipoglucemiante a través de un incremento en la secreción de insulina por las células  $\beta$  pancreáticas o que esté mediado por el bloqueo de canales  $K_{ATP}$ .

### **III. HIPÓTESIS**

Si los extractos de las plantas antidiabéticas con mayor actividad hipoglucemiante *in vivo* ejercen su acción modificando las concentraciones de la insulina en suero entonces su mecanismo de acción podría ser a través del bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP en músculo liso vascular.



## IV. OBJETIVOS

### III.1 Objetivo general

Estudiar el efecto producido por los extractos con mayor actividad hipoglucemiante *in vivo*, provenientes de cinco plantas antidiabéticas (*Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum*) sobre la concentración de insulina en suero y los canales de potasio dependientes de ATP.

### III.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos activos de *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum*.
- Confirmar el efecto hipoglucémico de los extractos obtenidos en ratones sanos.
- Evaluar el efecto de cinco extractos hipoglucemiantes sobre la concentración de insulina en suero en ratones sanos y con diabetes experimental.
- Evaluar el efecto de dos extractos como bloqueadores de los canales  $K_{ATP}$  en músculo liso vascular.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### V.1 Material vegetal

*Catharanthus roseus* se colectó en el poblado de Río viejo, Municipio de Tecuala, en el estado de Nayarit durante el mes de abril; *Cucurbita ficifolia*, fue colectada en el poblado de San Miguel, Estado de México durante el mes de febrero; *Ibervillea sonorae*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum* fueron adquiridas comercialmente en el mercado de plantas medicinales de “Sonora”, de la Ciudad de México. Su identificación botánica se realizó, con ayuda de la M. en C. Abigail Aguilar Contreras y el Biol. Santiago Xolalpa, usando reglas taxonómicas y por medio del cotejo con ejemplares del herbario-IMSSM.

### V.2 Obtención y caracterización de los extractos

La preparación de los extractos de *Catharanthus roseus* y *Psacalium peltatum* fue de la siguiente manera: 50 g de material seco y molido se colocaron en el interior de un equipo soxhlet y se realizaron extracciones continuas, de 5 horas cada una, con disolventes de menor a mayor polaridad (hexano, diclorometano, metanol y agua). El exceso de disolvente fue eliminado en un evaporador rotatorio a presión reducida. El residuo vegetal de las extracciones se mantuvo a temperatura de reflujo en agua destilada durante 5 horas. (Figura 3).

Los extractos de *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae* y *Plantago major* se obtuvieron como sigue: Se pesaron las partes usadas de las plantas, en el caso de poseer cáscara se despojó de ella y se cortó en rebanadas delgadas, eliminándose las semillas de cada una, quedando únicamente la parte del endocarpio.

Enseguida todas las rebanadas del fruto o partes de la planta se sometieron a un proceso de secado sobre una superficie plana. Esto se realizó a la sombra en un sitio con ventilación constante a temperatura ambiente. Después se molió en un molino eléctrico tipo 4 Wiley, con una malla de 1 mm, y se calculó el rendimiento total.

Extracto hexánico. Se tomó material vegetal seco pulverizado y se colocó en hexano por una semana a temperatura ambiente. El extracto se filtró y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio. El disolvente destilado se colocó en una segunda maceración, bajo las mismas

proporciones y el mismo tiempo. Al final se evaporó todo el disolvente para obtenerse un solo extracto.

### **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS** (*Catharanthus roseus* y *Psacalium peltatum*)

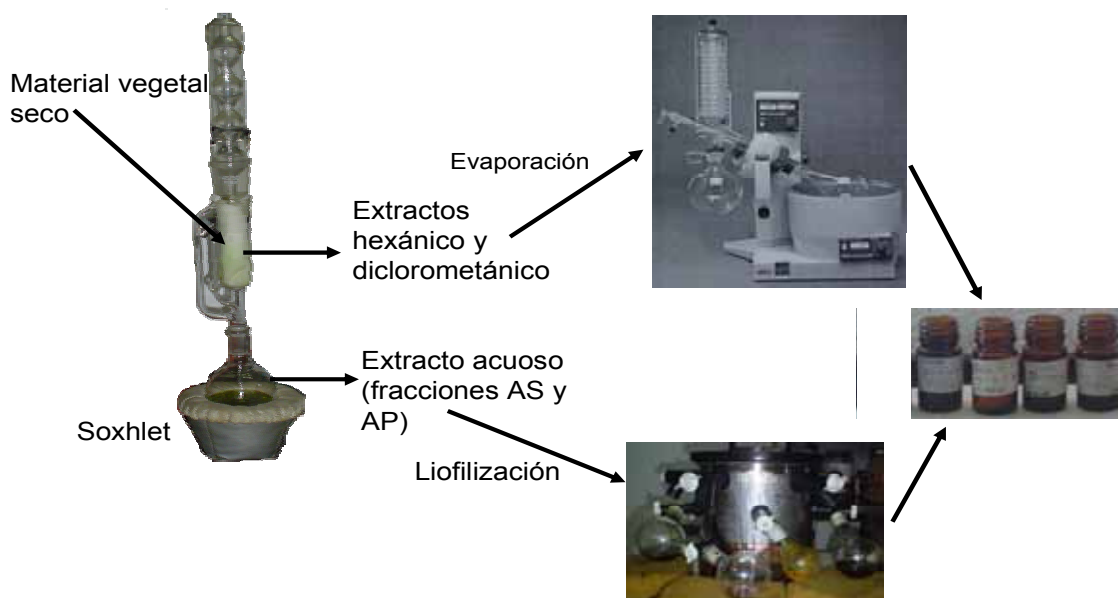


Figura 3. Representación esquemática de la preparación de extractos empleando un equipo soxhlet, un evaporador rotatorio y una liofilizadora.

**Extracto diclorometánico.** El residuo vegetal del extracto hexánico se colocó en diclorometano por una semana a temperatura ambiente. El extracto se filtró y concentró por evaporación del disolvente en el rotavapor. Con el disolvente obtenido se realizó una segunda maceración bajo las mismas condiciones, proporciones y tiempo.

**Extracto metanólico.** El residuo vegetal del extracto diclorometánico se colocó en metanol durante una semana a temperatura ambiente. El extracto se filtró y se evaporó el disolvente. El disolvente obtenido se utilizó por segunda ocasión para llevar a cabo el mismo proceso.

**Extracto acuoso.** El residuo del extracto metanólico se colocó en agua destilada durante 24 horas a temperatura ambiente. Se filtró y se sometió a un proceso de liofilización, posteriormente se calculó el rendimiento.

Los extractos activos señalados en la Tabla 2 para cada planta se evaluaron en animales sanos, con el propósito de revalidar su acción hipoglucemiante.

### V.3 Animales de experimentación

Los animales de experimentación fueron ratones sanos (cepa CD-1) machos, adultos, de 25 a 35 g de peso. Alimentados con nutricubos purina y agua a saciedad. Se formaron 3 grupos de 5 a 15 animales para el estudio de cada planta. La diabetes experimental en ratones se indujo mediante la administración de aloxana por vía intravenosa. La dosis total de aloxana (150 mg/kg), fue administrada en dos inyecciones con un intervalo de una semana (75 mg/kg en cada ocasión). Se consideró que se indujo la diabetes experimental a aquellos animales que presentaron niveles de glucosa sanguínea entre 200 y 350 mg/dL.

### V.4 Ensayos biológicos con los extractos

Este estudio se realizó con el objetivo de confirmar el efecto hipoglucémico de los extractos obtenidos de *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum*, ya que el tiempo de colecta podría haber afectado la actividad de dichos extractos.

### V.5 Estudio del efecto hipoglucémico producido por los extractos en ratones sanos

Los extractos se administraron a ratones sanos por vía intraperitoneal (250-500 mg/kg de peso corporal). Se obtuvieron muestras sanguíneas (aproximadamente 10  $\mu$ L) de la vena caudal, en ayunas ( $t=0$ ) y cada 120 minutos durante 6 horas para determinar la glucosa sanguínea. Este parámetro se determinó por duplicado usando tiras reactivas y un aparato (sensibilidad > 90%) para la determinación cuantitativa de glucosa en sangre (Accutrend Sensor, Roche). Los efectos producidos por los extractos fueron comparados con el producido por la administración de 125 mg/kg de tolbutamida.

### V.6 Estudio del efecto en la concentración de insulina en suero producido por los extractos en ratones sanos y diabéticos

Se obtuvo la muestra sanguínea (aproximadamente 120  $\mu$ L), mediante punción en el seno orbital del ojo, accediendo a éste por los márgenes de los ojos. La sangre se colectó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 3,000 g durante 15 min a 4°C (centrífuga GS-1512 Beckman). A continuación se separó el suero y se transfirió a tubos Eppendorf limpios, el suero se almacenó a  $-20 \pm 5$  °C para su uso posterior.

La determinación de la concentración de insulina en suero se realizó empleando un equipo de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) rata/ratón (Linco), especificidad del 100%. El límite menor y mayor de sensibilidad de este equipo es de 0.2 y 10 ng/mL de insulina en una muestra de 10  $\mu$ L de volumen.

Los principios de la determinación de insulina en suero son: 1) captura de las moléculas de insulina de las muestras problema depositadas en los pozos pre-tratadas con anticuerpos monoclonales de insulina anti-rata/ratón y la unión de estas moléculas capturadas a anticuerpos policlonales. Los anticuerpos monoclonales son secretados por un clon de hibridoma, línea celular utilizada en la producción de anticuerpos monoclonales, obtenida por fusión de linfocitos B productores de anticuerpos con células de una línea tumoral, así, todas las moléculas secretadas por el clon son idénticas entre sí. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes partes de una molécula de antígeno, 2) lavar los materiales no unidos de las muestras problema, 3) unión de la peroxidasa a los anticuerpos inmovilizados, 4) lavar los conjugados libre de enzima y 5) cuantificación de los conjugados inmovilizados enzima-anticuerpo en presencia del sustrato 3-3', 5-5'-tetrametilbenzidina. La actividad enzimática es medida espectrofotométricamente a 450 nm de absorbancia y corregida a 590 nm, después de la acidificación de los productos formados. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de insulina capturada en las muestras problema. El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Debido a que los extractos seleccionados de *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonorae*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum* han mostrado previamente actividad hipoglucemiante en modelos animales sanos y con diabetes inducida por aloxana, se propuso determinar su potencial como bloqueadores sobre canales  $K_{ATP}$  en músculo liso vascular, lo que indicaría que ejercen su acción hipoglucemiante a través del mismo mecanismo que las SU.

## V.7 Evaluación del potencial bloqueador de los canales $K_{ATP}$ de dos extractos

El modelo propuesto consistió en inducir mediante fenilefrina la contracción de los tejidos incubados con vehículo, glibenclamida o los extractos de las plantas bajo estudio. La contracción en los tejidos incubados con dimetilsulfóxido (DMSO)/Etanol fue inhibida por acción del diazóxido, activador de los  $K_{ATP}$ . Mientras que en los tejidos que fueron incubados con glibenclamida, la cual se une a su receptor (SUR) impidiendo que el diazóxido abra los canales de potasio, induciendo un promedio de contracción menor al registrado por DMSO/Etanol. Por su parte, en los tejidos incubados con los extractos se esperó que el promedio de la contracción se encontrara muy cercano al obtenido por la glibenclamida, lo que indicaría que también los extractos evaluados ejercen acción hipoglucemiante a través de los canales  $K_{ATP}$ .

Para estos estudios se emplearon ratas sanas, macho, de la cepa Wistar, de 250-300 g de peso corporal, las cuales se sacrificaron por anestesia profunda con pentobarbital (92.5 mg/kg); inmediatamente se extrajo la aorta torácica, que se colocó en una solución Ringer Krebs Bicarbonato (RKB) cuya composición en mM es: NaCl 120,  $\text{NaHCO}_3$  25, KCl 4.7,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  2.5 y glucosa 11, con un pH de 7.2-7.4. Se cortó la aorta torácica en 5 anillos tomados de la parte central y se colocaron en un baño de 5 ml de RKB. La actividad contráctil se registró a través de un transductor (tensión ajustada a 2g) en un polígrafo Grass modelo 7. Se lavó el tejido cada 15 min con la solución RKB y permaneció burbujeado con una mezcla de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante una hora para estabilizar la respuesta.

Enseguida se probó la viabilidad del tejido, induciendo la despolarización de la membrana con una solución de RKB  $K_{60\text{mM}}$  cuya composición mM es la siguiente: NaCl 64.7,  $\text{NaHCO}_3$  25, KCl 60,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  2.5 y glucosa 11. Esta operación se repitió empleando los tejidos con 96-100% de respuesta contráctil. Posteriormente estos se lavaron para que regresaran a su estado basal.

Se agregó fenilefrina  $3.2 \times 10^{-7}$  M en el baño para inducir una contracción sostenida y posteriormente se adicionaron dosis acumulativas

de diazóxido ( $1 \times 10^{-5}$  –  $1 \times 10^{-4}$  M) al tejido en el baño, en incrementos logarítmicos para inducir la relajación del tejido. Las dosis del diazóxido se agregaron cuando la respuesta con fenilefrina se estabilizó.

A continuación, los tejidos se lavaron durante 30 min aproximadamente para restaurar los valores basales. Se procedió a incubar los tejidos durante 30 min con los extractos acuosos de *Catharanthus roseus* y *Psacalium peltatum* –a diferentes concentraciones- (10.30 o 100  $\mu\text{g/mL}$ ), glibenclamida ( $1 \times 10^{-5}$  M) o el vehículo (DMSO/Etanol).

El efecto inducido por el diazóxido se expresó como el porcentaje de la inhibición inducida por fenilefrina  $3.2 \times 10^{-7}$  M.

#### V.8 Análisis estadístico

Se determinó el promedio  $\pm$  el error estándar en los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados. En los experimentos *in vivo* en ratones sanos, se calculó el área bajo la curva empleando el método del rectángulo y se determinó la concentración media de glucosa observada durante la misma y el porcentaje de reducción de la concentración media de glucosa en sangre para cada tratamiento. En los experimento *in vitro*, se calculó la respuesta máxima obtenida por los tratamientos aplicados. El efecto inducido por el diazóxido se graficó y expresó como el porcentaje de inhibición de la contracción inducida por fenilefrina  $3.2 \times 10^{-7}$  M. En todos los casos las diferencias se establecieron mediante un análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Se consideraron significativos los valores de  $P < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

La Tabla 3 muestra los rendimientos obtenidos para cada uno de los diferentes extractos de las cinco plantas bajo estudio. Cabe destacar que el mayor rendimiento obtenido fue para el extracto acuoso de la raíz de *P. peltatum*, tanto la fracción soluble como el precipitado, 4.5% y 4.8%, respectivamente. El menor rendimiento obtenido fue el precipitado del extracto acuoso de los frutos maduros e inmaduros de *C. ficifolia* 0.26% y 0.47%, respectivamente.

Tabla 3. Rendimientos de los extractos obtenidos de *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum*.

Nombre científico	Peso del material vegetal fresco	Peso del material vegetal seco y molido	Rendimiento de los extractos
<i>Catharanthus roseus</i> (Extracto acuoso)	Flor 2.6 kg Hoja 3.0 kg Tallo 2.7 kg Raíz 2.7 kg	50 g 50 g 50 g 50 g	Flor 1.15 % Hoja 1.32 % Tallo 1.19 % Raíz 1.21 %
<i>Cucurbita ficifolia</i> (Fracción del extracto acuoso)	Fruto maduro 21.9 kg  Fruto inmaduro 20.3 kg	841g  780 g	Soluble maduro 1.18 % Precipitado maduro 0.26 % Soluble inmaduro 3.06 % Precipitado inmaduro 0.47 %
<i>Ibervillea sonora</i> (Extracto diclorometánico)	Raíz 1.1kg	200 g	Raíz 1.87 %
<i>Plantago major</i> (Extracto hexánico y diclorometánico)	Semilla 3.9 kg	394.7 g	Semilla 0.93 % Semilla 1.10 %
<i>Psacalium peltatum</i> (Fracciones del extracto acuoso)	Raíz y rizoma 3.0 kg	50 g	Soluble raíz 4.5 % Precipitado raíz 4.8 %

La Tabla 4 muestra el efecto hipoglucémico obtenido en ratones sanos, después de la administración de los extractos acuosos de flores, hojas, tallos y raíces de *Catharanthus roseus*. La concentración de glucosa sanguínea basal no cambió significativamente en el control (solución salina isotónica), mientras que la administración de tolbutamida produjo reducción de la concentración de glucosa sanguínea, comenzando en el minuto 120 de  $54.8 \pm 2.7$  a  $47.6 \pm 5.3$  ( $P < 0.05$ ).

Los extractos acuosos de las partes empleadas de *Catharanthus roseus* redujeron significativamente la concentración de glucosa en sangre de ratones sanos, con respecto a los valores basales, al ser administrados ip



a una dosis de 250 mg/kg. Los extractos acuosos de flores y hojas causaron reducciones significativas con respecto a la concentración glucosa sanguínea basal a partir del minuto 120 de  $51.3 \pm 3.8$  a  $32.6 \pm 2.3$  mg/dL y  $48.6 \pm 2.8$  a  $41.3 \pm 7.1$  mg/dL, respectivamente ( $P < 0.05$ ); mientras que los extractos acuosos de tallos y raíces produjeron reducciones significativas en el minuto 360 de  $44.6 \pm 3.4$  a  $36.2 \pm 3.8$  mg/dL y  $59.6 \pm 2.0$  a  $39.4 \pm 3.7$  mg/dL, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Cabe mencionar que la concentraciones medias de glucosa en sangre, observada durante la prueba para los extractos acuosos de flor, hoja, tallo y raíz también mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores correspondientes de glucosa en sangre obtenidos con solución salina y tolbutamida ( $P < 0.05$ ).

Tabla 4. Efecto de la administración ip de los extractos acuosos de *Catharanthus roseus* sobre la glucosa sanguínea de ratones sanos y concentración media de glucosa en sangre.

Tratamiento	Dosis	Glucosa mg/dL				Concentración media de glucosa en sangre (mg/dL)
		0 min	120 min	240 min	360 min	
Solución salina	4 ml/kg	$58.0 \pm 6.0$	$58.6 \pm 7.1$	$58.6 \pm 5.9$	$58.5 \pm 3.1$	$58.8 \pm 2.5^c$
Tolbutamida	125 mg/kg	$54.8 \pm 2.7$	$47.6 \pm 5.3^a$	$30.2 \pm 1.8^a$	$28.0 \pm 1.6^a$	$39.7 \pm 0.7^b$
Acuoso flor	250 mg/kg	$51.3 \pm 3.8$	$32.6 \pm 2.3^a$	$34.3 \pm 3.5^a$	$25.8 \pm 2.4^a$	$35.3 \pm 2.3^{b,c}$
Acuoso hojas	250 mg/kg	$48.6 \pm 2.8$	$41.3 \pm 7.1^a$	$35.6 \pm 2.7^a$	$24.1 \pm 4.2^a$	$37.7 \pm 1.8^{b,c}$
Acuoso tallo	250 mg/kg	$44.6 \pm 3.4$	$43.7 \pm 4.0$	$42.6 \pm 3.4$	$36.2 \pm 3.8^a$	$41.9 \pm 1.5^{b,c}$
Acuoso raíz	250 mg/kg	$59.6 \pm 2.0$	$54.8 \pm 2.2$	$39.8 \pm 3.8$	$39.4 \pm 3.7^a$	$48.0 \pm 1.4^{b,c}$

Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E n=6

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  con respecto a glucosa inicial

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  con respecto a solución salina

<sup>c</sup>  $P < 0.05$  con respecto a tolbutamida

La Tabla 5 muestra el efecto hipoglucémico obtenido por la administración de las fracciones acuosas de los frutos de *Cucurbita ficifolia* en ratones sanos. La concentración de glucosa en sangre del grupo control no mostró cambios significativos, mientras que la administración de tolbutamida redujo significativamente la concentración sanguínea de glucosa, comenzando en el minuto 240 de  $61.8 \pm 4.0$  mg/dL a  $51.1 \pm 4.0$  mg/dL ( $P < 0.05$ ).

Tabla 5. Efecto de la administración ip de las fracciones acuosas de los frutos maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* sobre la concentración de la glucosa sanguínea de ratones sanos y se muestra también la concentración media de glucosa en sangre.

Tratamiento	Dosis	Glucosa mg/dL				Concentración media de glucosa en sangre (mg/dL)
		0 min	120 min	240 min	360 min	
Solución salina	4 ml/kg	65.0±4.2	63.0±4.3	61.0±3.5	60.6±3.7	62.3±1.7 <sup>c</sup>
Tolbutamida	125 mg/kg	61.8±4.0	55.7±4.0	51.1±4.0 <sup>a</sup>	51.0±4.0 <sup>a</sup>	54.4±0.6 <sup>b</sup>
Fracción maduro Soluble	500 mg/kg	57.6±1.0	45.6±2.1	43.1±2.3 <sup>a</sup>	39.4±2.3 <sup>a</sup>	45.6±2.0 <sup>b,c</sup>
Precipitado	500 mg/kg	52.4±1.3	49.0±3.3	40.4±1.4 <sup>a</sup>	40.0±0.8 <sup>a</sup>	45.1±1.7 <sup>b,c</sup>
Fracción inmaduro Soluble	500 mg/kg	58.0±3.5	42.4±3.1	37.0±3.3 <sup>a</sup>	35.2±0.7 <sup>a</sup>	42.1±2.2 <sup>b,c</sup>
Precipitado	500 mg/kg	61.4±2.8	51.2±5.0	35.2±4.7 <sup>a</sup>	40.2±2.7 <sup>a</sup>	45.9±2.1 <sup>b,c</sup>

Cada valor representa el promedio ±E.E n=6

<sup>a</sup> P<0.05 con respecto a glucosa inicial

<sup>b</sup> P<0.05 con respecto a solución salina

<sup>c</sup> P<0.05 con respecto a tolbutamida

Las fracciones solubles y los precipitados de los frutos maduro e inmaduro de *C. ficifolia* redujeron significativamente la concentración de glucosa sanguínea con respecto a su valor basal al ser administrados ip a una dosis de 500 mg/kg. La fracción soluble y el precipitado del fruto maduro redujeron significativamente la concentración de glucosa en sangre, con respecto a sus valores basales, comenzando en el minuto 240 de 57.6±1.0 mg/dL a 43.1±2.3 mg/dL y 52.4±1.3 mg/dL a 40.4±1.4 mg/dL, respectivamente (P<0.05). La fracción soluble del fruto inmaduro ocasionó la reducción de la concentración de glucosa sanguínea a partir del minuto 240, de 58.0±3.5 mg/dL a 37.0±3.3 mg/dL; mientras que la concentración de glucosa sanguínea con el precipitado se modificó de 61.4±2.8 mg/dL a 35.2±4.7 mg/dL (P<0.05). Cabe subrayar que las concentraciones medias de glucosa en sangre de las fracciones de los extractos acuosos del fruto maduro e inmaduro mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores correspondientes de glucosa plasmática obtenidos con solución salina y tolbutamida (P<0.05).

La Tabla 6 muestra el efecto hipoglucémico obtenido en ratones sanos después de la administración de los extractos diclorometánico de la raíz de *Ibervillea sonora*, hexánico y diclorometánico de las semillas de *Plantago major* y las fracciones acuosas de raíz y rizomas de *Psacalium peltatum*. La concentración de glucosa sanguínea de los grupos control (aceite de maíz y solución salina isotónica) no mostró diferencias significativas durante la prueba, mientras que la tolbutamida redujo significativamente la concentración glucosa en sangre al minuto 120, de 61.6±2.7 mg/dL a 54.3±2.9 mg/dL (P<0.05).

Tabla 6. Efecto de la administración ip de los extractos de *Ibervillea sonora*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum* sobre la concentración de la glucosa sanguínea de ratones sanos y se muestra también la concentración media de glucosa en sangre.

Tratamiento	Dosis	Glucosa mg/dL				Concentración media de glucosa en sangre (mg/dL)
		0 min	120 min	240 min	360 min	
Aceite de maíz	4 ml/kg	66.8±0.8	66.5±1.0	67.8±5.5	66.0±3.8	67.2±1.0 <sup>d</sup>
Solución salina	4 mg/kg	69.9±3.3	69.0±4.6	72.1±2.9	62.4±3.4	69.1±0.9 <sup>d</sup>
Tolbutamida	125 mg/kg	61.6±2.7	54.3±2.9 <sup>a</sup>	56.8±3.0 <sup>a</sup>	52.4±2.4 <sup>a</sup>	55.8±1.1 <sup>b,c</sup>
<i>Ibervillea sonora</i> Diclorometánico	500 mg/kg	68.8±6.6	60.2±7.7	35.2±5.4 <sup>a</sup>	20.0±3.2 <sup>a</sup>	46.5±0.7 <sup>b,d</sup>
<i>Plantago major</i> Hexánico	500 mg/kg	67.0±2.3	43.5±1.7 <sup>a</sup>	31.3±1.2 <sup>a</sup>	32.0±1.3 <sup>a</sup>	41.4±1.2 <sup>b,d</sup>
<i>Plantago major</i> Diclorometánico	500 mg/kg	71.0±3.3	49.0±4.3 <sup>a</sup>	40.4±3.4 <sup>a</sup>	38.4±3.7 <sup>a</sup>	48.0±1.7 <sup>b,d</sup>
<i>Psacalium peltatum</i> Soluble	500 mg/kg	68.8±10.2	59.2±9.5 <sup>a</sup>	49.7±5.5 <sup>a</sup>	34.3±4.4 <sup>a</sup>	53.5±2.0 <sup>c,d</sup>
<i>Psacalium peltatum</i> Precipitado	500 mg/kg	70.5±5.3	64.7±5.6	52.8±6.2 <sup>a</sup>	40.1±5.2 <sup>a</sup>	57.6±2.1 <sup>c,d</sup>

Cada valor representa el promedio ±E.E n=6

<sup>a</sup> P<0.05 con respecto a glucosa inicial

<sup>b</sup> P<0.05 con respecto a aceite de maíz

<sup>c</sup> P<0.05 con respecto a solución salina

<sup>d</sup> P<0.05 con respecto a tolbutamida

La administración del extracto diclorometánico de *I. sonora*, así como los extractos hexánico y diclorometánico de *P. major* y las fracciones acuosas de *P. peltatum* causaron efecto hipoglucémico significativo. El extracto diclorometánico de *I. sonora*, redujo la concentración de glucosa

sanguínea al minuto 240 de  $68.8 \pm 6.6$  mg/dL a  $35.2 \pm 5.4$  mg/dl ( $P < 0.05$ ), mientras que los extractos hexánico y diclorometánico de las semillas de *P. major*, redujeron la concentración de glucosa sanguínea de  $67.0 \pm 2.3$  mg/dL a  $43.5 \pm 1.7$  mg/dL y  $71.0 \pm 3.3$  mg/dL a  $49.0 \pm 4.3$  mg/dL, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Por su parte, la fracción soluble y el precipitado del extracto acuoso de las raíces y rizomas de *P. peltatum* redujeron de manera significativa la concentración de glucosa sanguínea de ratones sanos al ser comparados con sus controles a partir del minuto 120, de  $68.8 \pm 10.2$  mg/dL a  $59.2 \pm 9.5$  mg/dL y  $70.5 \pm 5.3$  a  $52.8 \pm 6.2$  mg/dL, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Cabe mencionar que los valores de concentración media de glucosa en sangre de los extractos diclorometánico de *Ibervillea sonora*, los extractos hexánico y diclorometánico de *Plantago major* y las fracciones del extracto acuoso de *Psacalium peltatum* mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores de los controles ( $P < 0.05$ ).

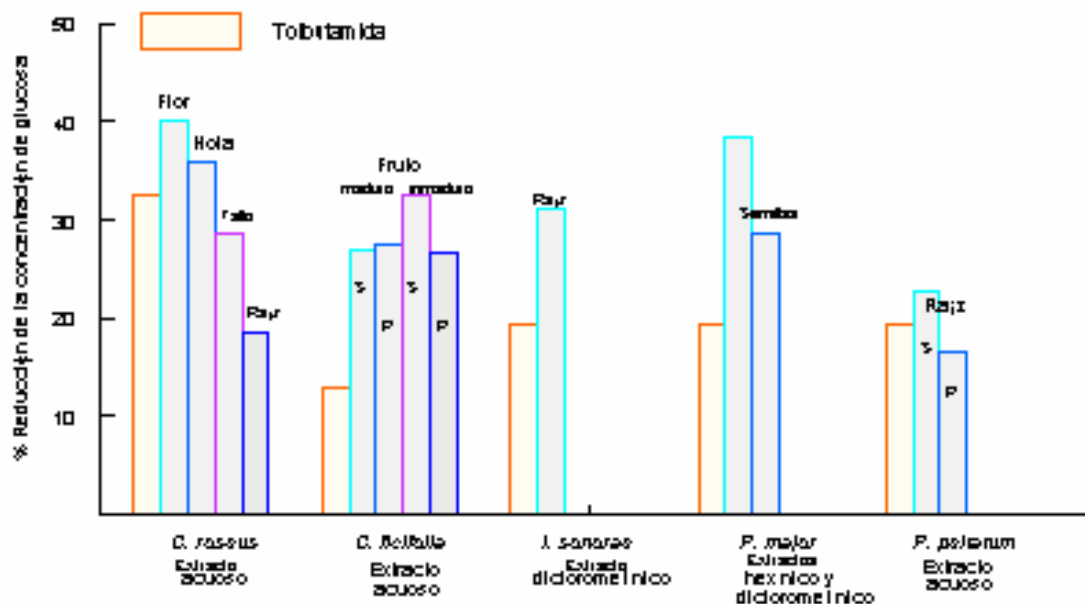


Figura 4. Porcentaje de reducción inducido por tolbutamida (n=6) y los diferentes extractos estudiados (n=6) sobre la concentración media de glucosa en sangre del área bajo la curva.

La figura 4 muestra el porcentaje de reducción de la concentración media de glucosa en sangre del área bajo la curva, inducida por tolbutamida y los diferentes extractos, con respecto a su control (solución salina o aceite de maíz). Se observa que los porcentajes de reducción de la concentración media de glucosa en sangre inducida por los extractos acuosos de flor y hoja

de *Catharanthus roseus*, la fracción soluble del extracto acuoso del fruto maduro de *Cucurbita ficifolia*, el extracto diclorometánico de raíz de *Ibervillea sonora* y el extracto hexánico de las semillas de *Plantago major* son superiores al 30%. Por su parte, los extractos acuosos de tallo y raíz de *C. roseus*, las fracciones del extracto acuoso de fruto maduro de *C. ficifolia*, así como el precipitado del fruto maduro y las fracciones del extracto acuoso de la raíz de *P. peltatum*, presentan porcentajes de reducción de la concentración media de glucosa en sangre inferiores al 30%.

Tabla 7. Efecto de la administración ip de los extractos acuosos del fruto inmaduro de *Cucurbita ficifolia*, la raíz de *Psacalium peltatum* y el extracto diclorometánico de la raíz de *Ibervillea sonora* (500 mg/kg) sobre la glucosa sanguínea e insulina sérica de ratones sanos y con diabetes experimental inducida por aloxana.

Tratamiento	n	Glucosa mg/dL		Insulina ng/mL	
		0min	240min	0min	240min
Sanos Control (SSI)	6	66.6±3.4	69.7±6.8	2.028±0.691 (n=8)	2.091±0.021
<i>C. ficifolia</i>	6	58.8±2.2	41.4±3.1 <sup>a,b</sup>		2.202±0.059
<i>I. sonora</i>	5	58.0±4.7	33.3±5.6 <sup>a,b</sup>		2.312±0.067
<i>P. peltatum</i>	5	57.8±3.5	45.6±2.7 <sup>a,b</sup>		2.150±0.049
Diabéticos Control (SSI)	6	319.7±30.2	315.8±87.6 <sup>a,b</sup>	1.970±0.036	1.974±0.089
Tolbutamida	6	324.2±39.9	132.7±26.3 <sup>a,b</sup>		2.336±0.007 <sup>a</sup>
<i>C. ficifolia</i>	6	360.0±22.7	149.3±48.0 <sup>a,b</sup>		2.155±0.100
<i>I. sonora</i>	5	468.2±35.0	170.3±18.3 <sup>a,b</sup>		2.286±0.093
<i>P. peltatum</i>	6	472.4±74.1	169.3±41.3 <sup>a,b</sup>		2.143±0.061

Cada valor representa el promedio ±EE

<sup>a</sup> P<0.05 con respecto a su glucosa e insulina inicial

<sup>b</sup> P<0.05 con respecto a su control

La Tabla 7 muestra el efecto de la administración de los extractos acuosos del fruto inmaduro de *Cucurbita ficifolia* y la raíz de *Psacalium peltatum* sobre la concentración de glucosa sanguínea e insulina sérica de ratones sanos sometidos a ayuno y diabéticos no sometidos a ayuno. La concentración de glucosa en sangre de ratones sanos y diabéticos no mostró cambios significativos en el grupo control, mientras que la administración de tolbutamida a ratones con diabetes experimental redujo significativamente la concentración de glucosa en sangre (de 324.2±39.9 mg/dL a 132.7±26.3 mg/dL) e incrementó la concentración de insulina en

suero (de  $2.013 \pm 0.057$  ng/mL a  $2.334 \pm 0.007$  ng/mL) en el minuto 240 ( $P < 0.05$ ).

El extracto acuoso del fruto inmaduro de *Cucurbita ficifolia* redujo de manera significativa ( $P < 0.05$ ) la glucosa sanguínea con respecto a su valor basal en ratones sanos sometidos a ayuno (de  $58.8 \pm 2.2$  mg/dL a  $41.4 \pm 3.1$  mg/dL), así como también en ratones diabéticos no sometidos a ayuno (de  $360 \pm 22.7$  mg/dL a  $149.3 \pm 48.0$  mg/dL) y modifico la concentración de insulina en suero en ratones sanos y diabéticos de  $2.028 \pm 0.691$  ng/mL a  $2.202 \pm 0.059$  ng/mL y  $1.970 \pm 0.036$  ng/mL a  $2.155 \pm 0.100$  ng/mL respectivamente. El extracto diclorometánico de la raíz de *Ibervillea sonora* redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) las concentraciones de glucosa en sangre en ambos modelos experimentales (de  $58.0 \pm 4.7$  mg/dL a  $33.3 \pm 5.6$  mg/dL y de  $468.2 \pm 35.0$  mg/dL a  $170.3 \pm 18.3$  mg/dL, respectivamente), con respecto a su valor basal y modificando la concentración de insulina en suero de  $2.028 \pm 0.691$  ng/mL a  $2.312 \pm 0.067$  ng/mL en ratones sanos y de  $1.970 \pm 0.036$  ng/mL a  $2.286 \pm 0.093$  ng/mL. Lo mismo sucedió con el precipitado acuoso de la raíz de *Psacalium peltatum* (de  $57.8 \pm 3.5$  mg/dL a  $45.6 \pm 2.7$  mg/dL en ratones sanos y de  $472.4 \pm 74.1$  mg/dL a  $169.3 \pm 41.3$  mg/dL en ratones diabéticos) con respecto a su valor basal y modificando la concentración de insulina en suero en ratones sanos y diabéticos de  $2.028 \pm 0.691$  ng/mL a  $2.150 \pm 0.049$  ng/mL y  $1.970 \pm 0.036$  ng/mL a  $2.143 \pm 0.061$  ng/mL, respectivamente. Aunque se observa cierta tendencia de incremento en la concentración de insulina en suero, ninguno de éstos extractos mostró diferencias estadísticas significativas con respecto al grupo control.

La Tabla 8 muestra el efecto de la administración de los extractos acuosos del tallo de *Catharanthus roseus* y el fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* sobre la concentración de glucosa sanguínea e insulina sérica de ratones sanos y diabéticos no sometidos a ayuno. La concentración de glucosa en sangre del grupo control en ambos modelos experimentales no mostró cambios significativos.

El extracto acuoso del tallo de *Catharanthus roseus* al ser administrados ip a una dosis de 250 mg/kg redujo significativamente la concentración de glucosa sanguínea de  $109.4 \pm 8.6$  mg/dL a  $71.3 \pm 2.3$  mg/dL

en ratones sanos y  $373.5 \pm 65.4$  mg/dL a  $171.3 \pm 83.8$  mg/dL en ratones diabéticos ( $P < 0.05$ ).

Tabla 8. Efecto de la administración ip de los extractos acuosos del tallo de *Catharanthus roseus* (250 mg/kg) y el fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* (500 mg/kg) sobre la glucosa sanguínea e insulina sérica de ratones sanos y con diabetes experimental inducida por aloxana.

Tratamiento	n	Glucosa mg/dL		Insulina ng/mL	
		0min	240min	0min	240min
Sanos Control (SSI)	15	108.6±4.4	112.0±4.9	2.359±0.088	2.227±0.064
<i>C. roseus</i>	6	109.4±8.6	71.3±2.3 <sup>a,b</sup>	2.465±0.178	2.083±0.041
<i>C. ficifolia</i>	5	109.4±8.4	60.6±5.2 <sup>a,b</sup>	2.104±0.105	2.071±0.040
Diabéticos Control (SSI)	6	443.9±31.5	438.0±66.1 (n=3)	1.955±0.044	1.946±0.067 (n=3)
<i>C. roseus</i>	5	373.5±65.4	171.3±83.8 <sup>a,b</sup>		1.963 ±0.037
<i>C. ficifolia</i>	6	380.2±61.7	188.3±49.9 <sup>a,b</sup>		2.396±0.140

Cada valor representa el promedio ±EE

<sup>a</sup>  $P < 0.05$  con respecto a su glucosa e insulina inicial

<sup>b</sup>  $P < 0.05$  con respecto a su control

El extracto acuoso del fruto maduro de *Cucurbita ficifolia* redujo significativamente la concentración de glucosa plasmática de ratones sanos y diabéticos de  $109.4 \pm 8.4$  mg/dL a  $60.6 \pm 5.2$  mg/dL y  $380.2 \pm 81.7$  mg/dL a  $188.3 \pm 49.9$  mg/dL, respectivamente ( $P < 0.05$ ). Cabe subrayar, que la administración del extracto de *C. ficifolia* a ratones diabéticos modificó la concentración de insulina en suero en ratones diabéticos de  $1.955 \pm 0.0438$  a  $2.396 \pm 0.140$ , sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo.

En la figura 5 se muestran las diferentes curvas que representan el porcentaje de inhibición producida por dosis crecientes de diazóxido en los tejidos previamente contraídos con fenilefrina, posterior a la incubación con DMSO/Etanol, glibenclamida o el extracto acuoso de hoja de *Catharanthus roseus* a 10, 30 y 100 µg/mL.

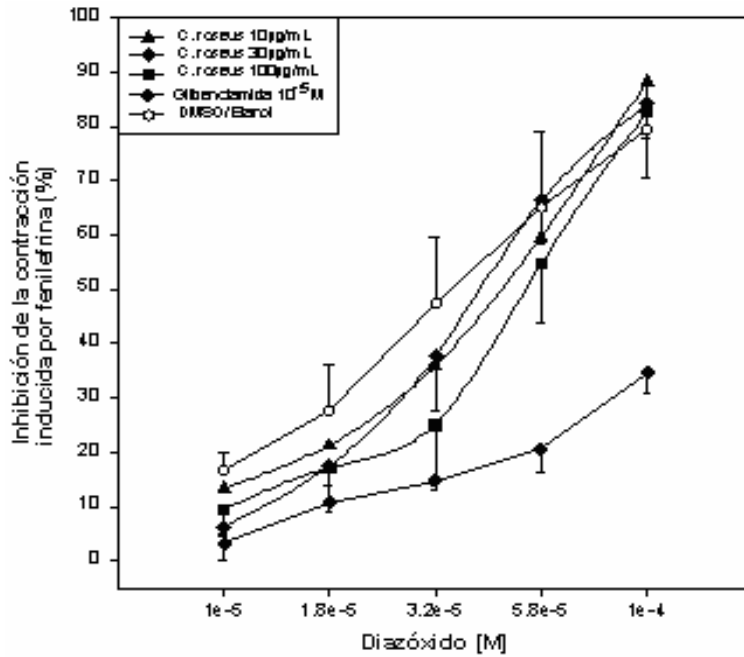


Figura 5. Efecto del extracto acuoso de hoja de *Catharanthus roseus* (10µg/mL, ▲ 30µg/mL ◆, 100µg/mL ■), glibenclamida (● 1X10<sup>-5</sup> M), o DMSO/Etanol (○) sobre la relajación inducida por diazóxido en anillos aórticos previamente contraídos con fenilefrina (3.2X10<sup>-7</sup> M) n=3. Los puntos representan el promedio y las líneas verticales el error estándar.

Se observa que el máximo de inhibición de la contracción para los tejidos incubados con glibenclamida fue poco mayor de 30%, mientras que el porcentaje de inhibición calculada para los tejidos incubados con DMSO/Etanol y las tres concentraciones del extracto fueron mayores al 80%. Es decir, que al incubar los tejidos con glibenclamida la mayoría de los canales K<sub>ATP</sub> son ocupados y se bloquean, impidiendo que estos canales puedan ser abiertos por el diazóxido, de ahí que la incubación con glibenclamida provoque obtener el 30% de inhibición de la contracción. Por otro lado, al incubar los tejidos con sustancias que no ocupan y bloquean los canales K<sub>ATP</sub>, éstos se encontraran disponibles para que al adicionar el diazóxido ejerza su acción libremente abriendo los canales y abatiendo la contracción, debido a que al inducirse la apertura de estos canales la membrana plasmática se repolariza, lo que resulta en el cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje teniendo como resultado la inactivación del complejo calcio-calmodulina, involucrado en la contracción muscular, teniendo como resultado la obtención de valores mayores de la inhibición de la contracción al compararlos con los obtenidos por la incubación la glibenclamida. Por lo que es evidente que ninguna de las



concentraciones empleadas de *Catharanthus roseus* bloquearon los canales  $K_{ATP}$  localizados en la aorta torácica de rata de la misma manera que la glibenclamida.

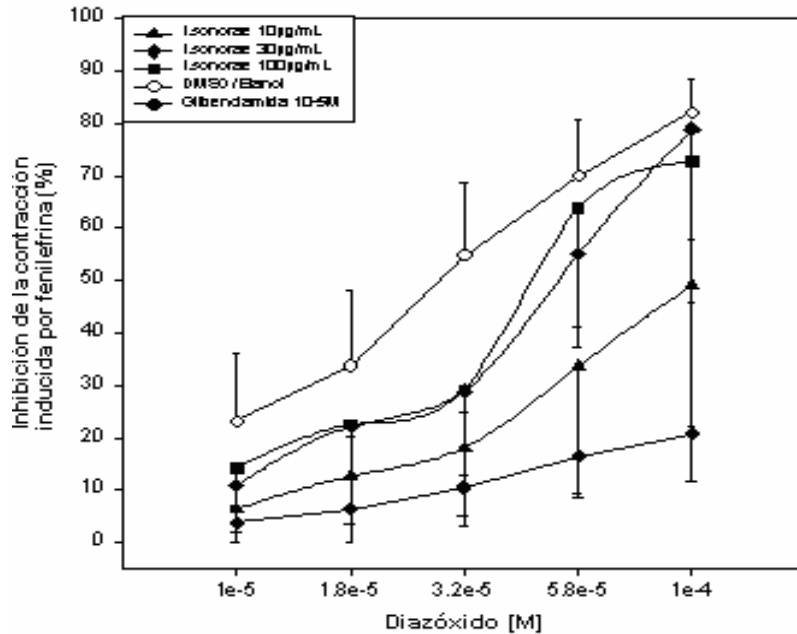


Figura 6. Efecto del extracto diclorometánico de raíz de *Ibervillea sonora* (10µg/mL ▲, 30µg/mL ◆, 100µg/mL ■), glibenclamida (● $1 \times 10^{-5}$  M), o DMSO/Etanol (○) sobre la relajación inducida por diazóxido en anillos aórticos previamente contraídos con fenilefrina ( $3.2 \times 10^{-7}$  M) n=3. Los puntos representan el promedio y las líneas verticales el error estándar.

En los resultados observados en el estudio realizado a el extracto diclorometánico de raíz de *Ibervillea sonora* (Figura 6) el máximo de inhibición de la contracción para los tejidos incubados con glibenclamida fue poco mayor de 10%, mientras que el porcentaje de inhibición calculada para los tejidos incubados con DMSO/Etanol y dos concentraciones del extracto, 10 y 30 µg/mL se encuentran entre el 70% y el 80%, mientras que la dosis menor de éste presentó cierta tendencia a bloquear los canales  $K_{ATP}$ , por lo que resulta pertinente proponer la realización de estudios adicionales para *Ibervillea sonora*.

## VII. DISCUSIÓN

Los extractos acuosos de flor, hoja, tallo y raíz de *Catharanthus roseus* tienen un efecto significativo en la disminución de la glucosa sanguínea de ratones sanos. El efecto producido por la tolbutamida en este estudio, valida el modelo experimental empleado. Estos resultados confirman también la actividad hipoglucemiante observada por Srinivas y col. (2003). De acuerdo a los valores de la concentración media de glucosa en sangre, observada durante el estudio, los extractos acuosos de tallo y raíz ejercen mayor efecto hipoglucémico en comparación con los extractos acuosos de flor y hoja ( $P < 0.05$ ). El efecto hipoglucémico de los extractos acuosos fue evidente con la dosis de 250 mg/kg.

Los estudios realizados con las fracciones del extracto acuoso del fruto maduro e inmaduro de *Cucurbita ficifolia* revelan que ambas tienen efecto hipoglucémico en ratones sanos, confirmando el efecto hipoglucémico previamente observado por Acosta y col. (2001) y Alarcón y col. (2002). De acuerdo con los valores de la concentración media de glucosa en sangre, las fracciones del extracto acuoso del fruto maduro e inmaduro ejercen mayor efecto hipoglucémico que la tolbutamida ( $P < 0.05$ ). El efecto hipoglucémico fue evidente con la dosis de 500 mg/kg.

Por su parte, el extracto diclorometánico de raíz de *Ibervillea sonora*, los extractos hexánico y diclorometánico de las semillas de *Plantago major* y las fracciones del extracto acuoso de *Psacalium peltatum* tienen efecto hipoglucémico significativo en ratones sanos, confirmándose el efecto biológico previamente reportado (Alarcón y col., 2002). De acuerdo con los valores de la concentración media de glucosa en sangre, el extracto diclorometánico de *Ibervillea sonora*, los extractos hexánico y diclorometánico de las semillas de *Plantago major* y la fracción soluble del extracto acuoso de *Psacalium peltatum* ejercen un mayor efecto hipoglucémico en comparación con el precipitado de el extracto acuoso de *Psacalium peltatum* ( $P < 0.05$ ).

Los estudios efectuados en relación al efecto sobre la concentración de insulina en suero producidos por la administración de los cinco extractos seleccionados, se realizaron con el objetivo de investigar si estos provocan el incremento en la concentración de insulina en suero, de manera similar a

como lo hacen las sulfonilureas. El incremento en la concentración de insulina en suero producido por la tolbutamida en ratones diabéticos valida este modelo experimental. Sin embargo, aunque la administración de los extractos produjo incremento en la concentración de insulina en suero, éstos no mostraron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* para la glibenclamida, en este trabajo son similares a los reportados previamente en otras investigaciones (Trube y col., 1986; Jones y col., 1997).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de dos extractos hipoglucemiantes como bloqueadores de los canales de potasio dependientes de ATP en músculo liso vascular, sin embargo, los resultados obtenidos para el extracto acuoso de hoja de *Catharanthus roseus* demuestran que no ejerce su efecto hipoglucémico a través del bloqueo de los canales  $K_{ATP}$ ; en relación a los resultados observados en el estudio para el extracto diclorometánico de la raíz de *Ibervillea sonora* se observó cierta tendencia, por lo que es pertinente realizar estudios adicionales.

Considerando que los extractos empleados de las especies vegetales seleccionadas mostraron efecto hipoglucémico significativo tanto en ratones sanos como en diabéticos, quedó demostrada la acción hipoglucemiante imputada a estas plantas. Sin embargo, los estudios realizados para dilucidar su mecanismo de acción mostraron que dicho efecto hipoglucémico no se realiza a través del incremento en los niveles séricos de insulina o del bloqueo de los canales  $K_{ATP}$ . Estos estudios permiten considerar que dicho efecto pueda atribuirse al aumento en la sensibilidad a la insulina en tejido hepático y en músculo; es decir, que no actúen directamente en las células  $\beta$  pancreáticas, pudiendo actuar disminuyendo la síntesis de triglicéridos, promoviendo la activación de alguna proteína que sea esencial en la disminución de la producción de glucosa hepática o bien, incrementando la actividad de una o varias enzimas clave involucradas en la glucólisis. Otra opción que no debe descartarse, es que puedan activar transportadores de glucosa, que resultaría en el incremento del consumo de glucosa por parte de los tejidos en donde se localicen dichos transportadores. También podrían retardar la digestión de hidratos de carbono, actuando a través de la inhibición de enzimas intestinales involucradas en la absorción de

oligosacáridos, mono y disacáridos. Sin descartar tampoco la posibilidad que actúen mediante el acoplamiento con cierto receptor, desencadenando una serie de eventos moleculares cuyo resultado sea la disminución de los picos glucémicos postprandiales.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Todos los extractos obtenidos de *Catharanthus roseus*, *Cucurbita ficifolia*, *Ibervillea sonora*, *Plantago major* y *Psacalium peltatum* ejercieron efecto hipoglucémico significativo en ratones sanos.
2. Los extractos acuoso del fruto inmaduro y maduro de *Cucurbita ficifolia*, del tallo de *Catharanthus roseus*, la raíz de *Psacalium peltatum*, así como el extracto diclorometánico de la raíz de *Ibervillea sonora* en la dosis probadas, incrementaron la concentración de insulina en suero en ratones sanos y diabéticos, no obstante el incremento no fue significativo.
3. El extracto diclorometánico de la raíz de *Ibervillea sonora*, así como el extracto acuoso de hoja de *Catharanthus roseus* a las dosis evaluadas, no bloquearon los canales de  $K_{ATP}$  en músculo liso vascular, en el modelo empleado.

## IX. REFERENCIAS

1. Acosta JL, Jiménez E, Juárez MA, Díaz JC. 2001. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J Ethnopharmacol* 77: 99-101.
2. Alarcón FJ, Román R, Jiménez M, Reyes R, Gonzáles B, Flores JL. 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol* 55: 171-177.
3. Alarcón FJ, Campos AE, Xolalpa S, Hernández E, Román R. 2002a. Hypoglycaemic activity of *Ibervillea sonora* roots in healthy and diabetic mice and rats. *Pharmaceutical Biol* 40: 570-575.
4. Alarcón FJ, Hernández E, Campos AE, Xolalpa S, Rivas JF, Vázquez LI, Román R. 2002b. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol* 82: 185-9.
5. Alarcón FJ, Román R, Flores JL, Aguirre. 2002c. Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res* 16: 383-386.
6. American Diabetes Association. ADA. 2004. Nutrition principles and recommendations. *Diabetes Care* 27: 536-546.
7. Andrade-Cetto A, Heinrich M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99: 325-348.
8. Argáez-López N, Wachter NH, Kumate-Rodríguez J, Cruz M, Talavera J, Rivera-Arce E, Lozoya X. 2003. The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care* 26:2470.
9. Ashcroft FM, Gribble FM. 2000. Tissue specific effects of sulfonylureas: lessons from studies of cloned K (ATP) channels. *J Diabetes Complications* 14: 192-6.
10. Ashfield R, Gribble F, Ashcroft S, Ashcroft F. 1999. Identification of the high affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K-ATP channel. *Diabetes* 48: 1341-1347.

11. Brayden JE. 2002. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 312-6.
12. Chattopadhyay RR. 1999. A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J Ethnopharmacol* 167:367-72.
13. Cheng AY, Fantus IG. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. (CMAJ) 18:213-226.
14. Clement J, Kunjilwar K, Gonzáles G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar L, Bryan J. 1997. Associations and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *Neuron* 18: 827-838.
15. Committee Report. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197.
16. Contreras C, Pérez S, Alarcón F, Román R. 2002a. Anti-hyperglycemic effect of *Psacalium peltatum*. *Proc West Pharmacol Soc* 45:134-6.
17. Contreras F, Romero B, Suárez N, González M, Fouilloux C, Guevara E, Betancourt MC, Torres D y Velasco M. 2002b. Receptores Sur y Sulfonilureas en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2, *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica (AVFT)* v.21 n.2.
18. Coopack S, Lant F, McIntosh S, Rodgers V. 1990. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *British J of Clin Pharmacol* 29: 673-684.
19. Cyrino FZ, Bottino DA, Coelho FC, Ravel D, Bouskela E. 2003. Effects of sulfonylurea on K (ATP) channel-dependent vasodilation. *J Diabetes Complications* 17: 6-10.
20. Doyle ME, Egan JM. 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* 55:105-131.
21. Draznin B. 1994. *Molecular biology of diabetes*. Vol I Ed. Human Press, New Jersey, pp 303-332.
22. Edelstein SL, Knowler WC, Bain RP, Reubin A, Barret-Connor EL, Dowse GK, Haffner SM, Pettit DJ, Muller DC, Collins VR, Hamman

- RF. 1997. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM. *Diabetes* 46:701-710.
23. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003a. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: S5-S20.
24. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2003b. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26:3160-3167.
25. Flores-Saenz JL, Trujillo-Arriaga HM, Rivas-Vilchis JF, Mendez-Francisco JD, Alarcon-Aguilar FJ, Roman-Ramos R. 2003. Crossover and double blind study with metformin and rosiglitazone in impaired glucose tolerance subjects. *Proc West Pharmacol Soc* 46:143-7.
26. Fonseca V, Kelley D, Cefalu W, Baron M, Purkayastha D, Nestler J, Hsia S, Gerich J. 2004. Hypoglycemic potential of nateglinide versus glyburide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 53:1331-5.
27. Goodman y Gilman. 1996. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol I, Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, pp 855-856.
28. Hamaguchi T, Hirose T, Asakawa H, Itoh Y, Kamado K, Tokunaga K, Tomita K, Masuda H, Watanabe N, Namba M. 2004 Efficacy of glimepiride in type 2 diabetic patients treated with glibenclamide. *Diabetes Res Clin Pract* 66 Suppl 1:S129-32.
29. Hernández E, Aguilar A, Aguilar L, Román R, Chávez AA, García LM, Flores JL, Alarcón FJ. 2002a. Studies on hypoglycemic activity of Mexican plants. *Proc. West. Pharmacol Soc* 45:118-124.
30. Hernández E, Campos AE, Alarcón FJ, Vázquez LI, Flores JL, Román R. 2002b. Acute toxicological study of *Cucurbita ficifolia* juice in mice. *Proc West Pharmacol Soc* 45:42-43.
31. Jones RB, Dickinson DM, Anthony DM, Marita AR, Kaul, Buckett WR. 1997. Evaluation of BTS 67 582, a novel antidiabetic agent, in normal and diabetic rats. *British J of Pharmacol* 120: 1135-1143.
32. Kaku K, Inoue Y, Kaneko T. 1995. Extrapropancreatic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes Res Clin Pract (suppl)* 28: S105- S108.



33. Katzung BG. 1999. Farmacología básica y clínica. Ed. Manual moderno, México, pp 203, 791-812.
34. King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414–1431.
35. Liss B, Roeper J. 2001. Molecular physiology of neural K-ATP channels. *Mol Membr Biol* 18: 117-127.
36. Litter M. 1998. Farmacología experimental y clínica. 7a. edición, ed. Ateneo, Argentina, pp 722.
37. Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2002. Biología celular y molecular. 4a. edición, ed. Médica Panamericana, México, pp 862-891, 923, 929-931.
38. Marcy TR, Britton ML, Blevins SM. 2004. Second-Generation Thiazolidinediones and Hepatotoxicity. *Ann Pharmacother* 38:1419-1423.
39. Mayer BD. 1991. Diabetes mellitus diagnosis and treatment. 3a. ed. Editorial Churchill Livingstone, Reino Unido. pp. 250.
40. Moore H, Summerbell C, Hooper L, Cruickshank K, Vyas A, Johnstone P, Ashton V, Kopelman P. 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD004097.
41. Mudaliar M, Henry M. 1999. Combination therapy for type 2 diabetes. *Endocr Pract* 5:208-19.
42. Nagashima K, Takahashi A, Ikeda H, Hamasaki A, Kuwamura N, Yamada Y, Seino Y. 2004. Sulfonylureas and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res and Clin Pract Suppl* 1: S-75-78.
43. Nakaya H, Miki I, Seino S, Yamada K, Inagaki N, Suzuki M, Sato t, Yamada M, Matsushita K, Krachi Y, Arita M. 2003. Molecular and functional diversity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: the pathophysiological roles and potential drug targets. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122: 243-250.
44. Nichols CG, Koster JC. 2002. Diabetes and insulin secretion: whither K<sub>ATP</sub>?. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E-403-E412.

45. Procks P, Reinmann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. 2002. Beta-cell stimulus-secretion coupling:  $K^+$  ATP channels and  $Ca^{+2}$ . Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 51: 368-376.
46. Quast U. and Cook N. 1989. In vitro and in vivo comparison of two  $K^+$  channel openers, diazóxido and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. *J Pharmacol Exp Ther* 1: 250-261.
47. Román R, Lara A, Alarcón FJ, Flores JL. 1992. Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch of Med Res* 23: 105-109.
48. Romo de Vivar A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Editorial Limusa. p.p. 72.
49. Samuelsen AB. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol* 71: 1-21.
50. Shieh Ch, Coghlan M, Sullivan J. 1996. Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities, *Pharmacol Rev* 52: 57-583.
51. Silberberg SD y Van Breemen C. 1991. An ATP, calcium and voltage sensitive potassium channel in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 172:517-522.
52. Singh SN, Vats P, Suri S, Shyam R, Kumria MM, Ranganathan S, Sridharan K. 2001. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 76:269-77.
53. Srinivas N, Murthy KB, Srinivas DL, y Ravindra BSB. 2003. The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. *BMC Complementary and Alternative Medicine* September 3:1-4
54. Stuart CA, Gilkison CR, Carlson RF, Stuart CA, Gilkison CR, Carlson RF. 1997. Effect of adding a sulfonylurea in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus previously well controlled with insulin. *Endocr Pract* 3:344-348.
55. Su S y Lee KS. 1994. Characterization of the ATP-inhibited  $K^+$  current in canine coronary smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 427: 110-120.

56. Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:536-546.
57. Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T. 1986. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependnet K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 407: 493-499.
58. WHO. (World Health Organization) Department of noncommunicable disease surveillance. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva. WHO/NCD/NCS/99.2 pp 1-66.
59. WHO. (World Health Organization) Department of noncommunicable disease surveillance. 2003. Screening for type 2 diabetes. Report of World Health Organization and International Diabetes Federation meeting. WHO/NMH/MNC/03.1 pp 1-54.
60. WHO. World Health Organization (<http://www.who.int/diabetes/en/>) consultada 3 Enero 2005.
61. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
62. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman M, Goodyear LJ, Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174.
63. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG, Schlattner U, Neumann D, Michael B, Freeman MB. 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. *J Biol Chem* 279: 43940-43951.
64. <http://www.medicineatyourfeet.com/plantagomajor.html> Consultada Mayo, 2006.
65. <http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/wereque.pdf> Consultada Mayo, 2006.
66. [http://www.iqb.es/d\\_mellitus/historia/historia01.html](http://www.iqb.es/d_mellitus/historia/historia01.html) Consultada Mayo, 2006.
67. <http://www.fao.org/docrep/T0646EOa.html> Consultada Mayo, 2006.

68. <http://www.biotech.icmb.utexas.edu/botany/perihist.vc.ehu.es/plfarm/46 Caro.html> Consultada Mayo, 2006.
69. <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/PsacaliumPeltatum.html> Consultada Mayo, 2006.