

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE  
DE LOS EXTRACTOS DE *Cecropia obtusifolia* Bertol.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A :

**M. EN BIOL. EXP. LUCÍA LOURDES AGUILAR SANTAMARÍA**

Directores de Tesis :

Dr. Rubén Román Ramos

Dr. Jaime Tortoriello García

A s e s o r e s

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Dr. José Domingo Méndez Francisco

México D.F.

Septiembre del 2004

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

**M. en Biol. Exp. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría**

El día 10 de septiembre del 2004

Sinodales:

Dr. Rubén Román Ramos: Presidente



---

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber: Vocal

---

Dr. José Domingo Méndez Francisco: Vocal

---

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar: Vocal



---

Dr. Jaime Tortoriello García: Secretario

---

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA SE ENCUENTRA EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y CUENTA CON APOYO BAJO EL CONVENIO PFP-20-93.

MI TOTAL RECONOCIMIENTO AL CONACYT POR LA BECA ECONÓMICA, CON REGISTRO 83524, OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRESENTE TRABAJO DOCTORAL.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

**M. en Biol. Exp. Lucía Lourdes Aguilar Santamaría**

El día 10 de septiembre del 2004

Sinodales:

Dr. Rubén Román Ramos: Presidente

---

Dra. Laura Patricia Álvarez Berber: Vocal

---

Dr. José Domingo Méndez Francisco: Vocal

---

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar: Vocal

---

Dr. Jaime Tortoriello García: Secretario

---

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTORES DE TESIS

#### **Dr. Rubén Román Ramos**

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

#### **Dr. Jaime Tortoriello García**

Investigador Titular "A". Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica del Sur. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

### ASESORES

#### **Dra. Laura Patricia Álvarez Berber**

Profesor Investigador Titular "B" Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigaciones Químicas. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

#### **Dr. José Domingo Méndez Francisco**

Investigador Titular "A". Instituto Mexicano del Seguro Social. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas. Centro Médico Nacional Siglo XXI. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores.

### SINODAL

#### **Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar**

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

El trabajo de Tesis fue desarrollado en los Laboratorios de:



Farmacología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la **Universidad Autónoma Metropolitana**, Unidad Iztapalapa.



Farmacología del **Centro de Investigación Biomédica del Sur** del Instituto Mexicano del Seguro Social.



Productos Naturales del **Centro de Investigaciones Químicas** de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

*Mi admiración y sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que con su erudición, apoyo y presencia facilitaron esta feliz conclusión. Particularmente:*

- ♫ Al Dr. Jaime Tortoriello, por las oportunidades de cambio y por permitirme aprender con libertad.*
- ♫ Al Dr. Rubén Román, por su ejemplo, entusiasmo, e invaluable soporte.*
- ♫ A la Dra. Laura Álvarez, por su entereza, y por compartir además de sus vastos conocimientos, un cálido espacio humano.*
- ♫ Al Dr. Francisco Alarcón, por su paciente disposición y metódica ayuda en los momentos más apremiantes.*
- ♫ Al Dr. José Domingo Méndez, por su disposición.*

*A los que me han privilegiado con el maravilloso tesoro de su amistad:*

- ♫ Ale Zamilpa por tu incondicional calidez, guía, y vigorizante afabilidad.. Por enseñarme lo que es correcto.*
- ♫ Pili Nicasio por tu confianza, ayuda espiritual y cariñosa presencia. Por enseñarme a disfrutar.*
- ♫ Fátima, porque cuando me sentí extraviada permaneciste a mi lado. Por tu valentía.*
- ♫ Pati Sotelo. porque no me cuestionas. Por tu disposición de auxiliar.*
- ♫ Ireneo Gaspar, porque siempre he contado contigo. Por tu enorme capacidad de dar.*
- ♫ Armando Herrera, por tu capacidad de compartir. Por tu empatía aquí y ahora.*
- ♫ Guillermo Ramírez, porque me has acompañado en días nublados. Por tu sesuda y determinante guía .*
- ♫ Manasés González, porque a pesar de tu congestionada agenda, siempre conté contigo.*
- ♫ A toda la banda del CIBIS, por su comprensión, disposición, auxilio y confianza.*
- ♫ A las niñas y niños del CIQ, a Silvia Marquina y Mari Garduño, por su ayuda y simpatía todos estos años..*

*A Don Teo, mi Papá, porque ha sido un ejemplo de rectitud, trabajo y dedicación amorosa.*

*A Doña Jose, mi Mamá, por mantener el entrañable fuego al que sigo retornando. Por su sagacidad, valentía y amor.*

*A mis fabulosas hermanas y hermanos, porque estamos y seguiremos juntos.*

*A mis queridos sobrinos, sobrinas y primos por permitirme compartir sus alegrías.*

*A esta maravillosa vida.*



*Caminante, no hay camino y al volver la vista atrás, se vé*

*que no hay que llegar primero, sino hay que saber llegar.*

*José Alfredo y Machado*

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
Relación de abreviaturas	iii
Relación de Tablas y Figuras	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Breve historia	3
1.2 Definición de diabetes mellitus	5
1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1	6
1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2	6
1.2.3 DM asociada a otros padecimientos o síndromes	8
1.2.4 DM gestacional	8
1.3 Criterios para el diagnóstico de la DM2	8
1.4 Patogénesis de la DM2	9
1.4.1 Resistencia a la insulina	9
1.4.2 Incremento en la producción hepática de glucosa	11
1.4.3 Falla de las células $\beta$	12
1.5 Factores de riesgo	13
1.6 Secreción de la insulina	14
1.6.1 Efectos biológicos de la insulina	15
1.7 Epidemiología	16
1.8 Tratamiento	17
1.8.1 Tratamiento no farmacológico	17
1.8.2 Tratamiento farmacológico	18
1.9 Especies vegetales utilizadas para el tratamiento de DM2 y sus complicaciones	23
<b>II. ANTEDECENTES</b>	
2.1 Clasificación taxonómica	25
2.2 Sinonimia botánica	25
2.2.1 Sinonimia popular	25
2.3 Distribución y hábitat	26
2.4 Descripción botánica	27
2.5 Aspectos fisiológicos	30
2.6 Manejo	30
2.7 Usos medicinales	31
2.8 Farmacología	31
2.8.1 Toxicidad	34

<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>35</b>
<b>IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>37</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
6.1 General	38
6.2 Particulares	38
<b>VII. METODOLOGÍA</b>	
7.1 Material vegetal	39
7.2 Pruebas farmacológicas	40
7.2.1 Fraccionamiento biodirigido	41
A) Extracto metanólico	41
B) Extracto acuoso	46
7.2.2 Toxicidad aguda	49
7.3 Estudio clínico	50
7.3.1 Formulación del fitofármaco	53
7.3.2 Estandarización del fitofármaco	53
7.4 Pruebas estadísticas	54
<b>VIII. RESULTADOS</b>	
8.1 Extracto metanólico	55
8.2 Extracto acuoso	60
8.3 Aislamiento de compuestos	63
8.4 Toxicidad aguda	63
8.5 Estudio clínico	66
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>75</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS</b>	<b>77</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b>	
Carta de consentimiento, estudio clínico	92
Artículo publicado	93

## RELACIÓN DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

<b>AC</b>	Ácido clorogénico	<b>HNF</b>	Factor de necrosis humana
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>IAA</b>	Autoanticuerpo contra Insulina
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina	<b>ICA</b>	Autoanticuerpo contra islotes
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza	<b>IAG</b>	Inhibidor de $\alpha$ -glucosidasas
<b>AO</b>	Ácido oleanólico	<b>IL</b>	Interleucina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina	<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>AU</b>	Ácido ursólico	<b>IMSSM</b>	Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social México
<b>CC</b>	Cromatografía en columna	<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina	<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50	<b>MODY</b>	Diabetes mellitus juvenil
<b>CLV</b>	Columna líquida de vacío	<b>OECD</b>	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
<b>DM</b>	Diabetes mellitus	<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1	<b>PGC1</b>	Gen coactivador de PPAR $\gamma$
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2	<b>PP</b>	Proteína fosfatasa
<b>DMG</b>	Diabetes mellitus gestacional	<b>PPAR</b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
<b>EUA</b>	Estados Unidos de Norteamérica	<b>PTG</b>	Proteína localizadora de glucógeno
<b>GAD</b>	Descarboxilasa del ácido glutámico	<b>PTP</b>	Proteína tirosil-fosfatasa
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases acoplada a masas	<b>PY</b>	Neuropéptido Y
<b>GIP</b>	Polipéptido insulínico dependiente de glucosa	<b>PYY</b>	Péptido YY
<b>GLP</b>	Péptido similar a glucagón	<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa	<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución	<b>SSF</b>	Solución salina fisiológica
		<b>STZ</b>	Estreptozotocina
		<b>TAD</b>	Tensión arterial diastólica

<b>TAS</b>	Tensión arterial sistólica	<b>UCP</b>	Proteína desacoplante
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento tumoral	<b>U.M.F.</b>	Unidad de medicina familiar
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral		

### ABREVIATURAS DE PRODUCTOS QUÍMICOS

<b>AC<sub>2</sub>O</b>	Anhídrido acético	<b>Cu<sup>++</sup></b>	Ión cobre
<b>Bu-OH</b>	n-Butanol	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Ión calcio	<b>Hex</b>	n-Hexano
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo	<b>K<sup>+</sup></b>	Ión potasio
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Cloruro de metileno	<b>Me-OH</b>	n-Metanol
<b>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O</b>	Éter etílico	<b>NO</b>	Óxido nítrico

## RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS CONTENIDAS EN EL TEXTO

### TABLAS

	<b>Página</b>
No. 1 Clasificación etiológica de la DM.	7
No. 2 Desactivación génica en ratones y su efecto sobre la RI y aparición de DM.	11
No. 3 Tratamientos farmacológicos disponibles para el tratamiento de la DM2.	19
No. 4 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EM-7, obtenida del extracto metanólico de <i>C. obtusifolia</i> .	43
No. 5 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EM-7, obtenida del extracto metanólico de <i>C. obtusifolia</i> .	44
No. 6 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción VIII, obtenida del extracto acuoso de <i>C. obtusifolia</i> .	44
No. 7 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EA-6, obtenida del extracto acuoso de <i>C. obtusifolia</i> .	47
No. 8 Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EA-7B, obtenida del extracto acuoso de <i>C. obtusifolia</i> .	48
No. 9 Parámetros biológicos evaluados en la prueba toxicológica.	50
No. 10 Métodos estándares para la cuantificación de metabolitos en plasma.	52
No. 11 Características generales de los pacientes al inicio del estudio clínico.	65
No. 12 Efecto sobre diversos parámetros metabólicos, producido por la administración, durante 21 días, del fitomedicamento de <i>C. obtusifolia</i> y <i>M. vulgare</i> en pacientes con DM2 descontrolada.	66

## FIGURAS

	<b>Página</b>
No. 1 Algoritmo de decisión terapéutica, basado en la glucemia en ayuno.	22
No. 2 Distribución de <i>Cecropia obtusifolia</i> en la República Mexicana.	27
No. 3 <i>Cecropia obtusifolia</i> , árbol silvestre.	27
No. 4 <i>Cecropia obtusifolia</i> , tronco y peciolos con cuerpos Müllerianos.	28
No. 5 Inflorescencia masculina.	29
No. 6 Inflorescencia femenina.	29
No. 7 Semillas de <i>Cecropia obtusifolia</i> .	29
No. 8 Ácido clorogénico e iso-orientina, compuestos con actividad hipoglucemiante en <i>C. obtusifolia</i> .	34
No. 9 Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de <i>C. obtusifolia</i> .	42
No. 10 Fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso de <i>C. obtusifolia</i> .	46
No. 11 Glucemia posterior a la administración i.p. de 2 g/kg del extracto Hexánico o las fracciones clorofórmica y acuosa I de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	56
No. 12 Glucemia posterior a la administración i.p. de 2 g/kg del extracto Metanólico o las fracciones butanólica, acuosa II o soluble en metanol de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	57
No. 13 Glucemia posterior a la administración i.p. de 1 g/kg de las fracciones Acuosa II, y soluble en metanol de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	58
No. 14 Glucemia posterior a la administración de 0.5 g/kg del extracto metanólico o las fracciones EM7- A,B,C,D de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	59
No. 15 Glucemia posterior a la administración de 0.5 g/kg del extracto acuoso o las fracciones de acetato de etilo, acuosa II y soluble en metanol de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	60
No. 16 Glucemia posterior a la administración de diferentes dosis del	61

	extracto acuoso o las fracciones acuosa II y soluble en metanol de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	
No. 17	Glucemia posterior a la administración de 0.5 g/kg del extracto acuoso ó 0.3 g/kg de la fracción soluble en metanol o EA-6 A,B,C y D de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	62
No. 18	Glucemia posterior a la administración de 0.4 g/kg de las fracciones EA-7 A,B y C de <i>C. obtusifolia</i> en ratones sanos.	62
No. 19	Compuestos aislados a partir de <i>C. obtusifolia</i> .	64





## RESUMEN

En la práctica médica tradicional en México, *Cecropia obtusifolia* es habitualmente utilizada para el manejo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Se ha reportado el efecto hipoglucémico de diversos extractos de la especie en animales sanos y tratados con aloxana, determinándose que no existe acción insulinomimética. El efecto hipoglucémico se atribuye a dos fenilpropanoides denominados ácido clorogénico (AC) e isoorientina; sin embargo, estos productos son menos activos que el extracto del que fueron aislados, por lo que es posible que no sean los únicos responsables de la actividad o que se requiera de más sustancias en la fracción activa que coadyuven o ejerzan el efecto hipoglucémico por sinergia.

En la presente tesis se evaluó el efecto de las diferentes fracciones, obtenidas por ensayos biodirigidos, de los extractos acuoso y metanólico de *C. obtusifolia* en ratones. Asimismo, se caracterizaron los constituyentes químicos más abundantes de las fracciones con actividad biológica: ácidos ursólico, oleanólico, hexadecenóico, arabinónico y bassico, además de,  $\beta$  sitosterol, su glucósido, estigmasterol, glucosa, myoinositol, friedelina y el glucósido del ácido absísico. Las pruebas toxicológicas en ratones establecieron que la administración única de 3 g/kg de peso, p.o, del extracto metanólico no causa efectos tóxicos, modificación conductual ni cambios histológicos.

Se diseñó un estudio clínico experimental con pacientes diabéticos con pobre control metabólico en el que durante 21 días, además de glibenclamida, se utilizó un fitomedicamento preparado a partir de *C. obtusifolia* y estandarizado en AC o un tratamiento placebo preparado con *Marrubium vulgare*. La glucemia al final del estudio disminuyó 15.2% y 0.6% en el grupo tratado con el fitofármaco o placebo respectivamente. La concentración plasmática de colesterol y triglicéridos disminuyó 14.6% y 42% ( $p < 0.02$ , ANOVA) en los pacientes tratados con *C. obtusifolia*, en el caso de *M. vulgare* la disminución fue de 4.2% y 5.8%, respectivamente. No se observaron efectos colaterales atribuibles a los tratamientos herbolarios.

Por la evidencia obtenida se concluye que la actividad hipoglucemiante de *C. obtusifolia* es el resultado de la acción de diversas sustancias. Como fitofármaco, es útil como coadyuvante en el tratamiento de pacientes con DM2, ya que produce efectos hipoglucemiante e hipolipemiante, aún en individuos con pobre control metabólico.



## ABSTRACT

*Cecropia obtusifolia* is used all over México for type 2 diabetes mellitus (DM2) control. The hypoglycemic effect of different extracts obtained from this species has been reported in healthy and alloxan treated animals and it is not insulin like. Such biological activity has been attributed to flavonoid compounds, chlorogenic acid and iso-orientin. Nevertheless, these purified materials produce a minor hypoglycemic effect than the original aqueous extract. It is possible that more elements are required in order to potentiate such hypoglycemic activity.

In the present study, the hypoglycemic activity of different fractions obtained as a result of bioguided analysis of the methanolic and aqueous extracts of *C. obtusifolia* was evaluated in mice. In addition, chemical constituents from the active fractions were separated by phytochemical techniques and determined as: ursolic, oleanolic, hexadecenoic, arabinonic and bassic acids; besides,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol glucoside, stigmasterol, glucose, myo-inositol, friedelin and abscisic acid glucoside. Toxicological tests established that the single administration of 3 g/kg p.o. in mice, did not cause any visible symptoms of toxicity, behavior modification or histologic changes.

Effectiveness and tolerability of a standardized phytopharmaceutical obtained from *C. obtusifolia* (containing 2.99 mg of chlorogenic acid/g of dried plant), was clinically evaluated in DM patients with poor response to glibenclamide. Patients, all maintaining conventional therapy, were treated for 21 days with *C. obtusifolia* phytopharmaceutical (22 persons) or with an identical product formulated with *Marrubium vulgare* (21 people). The fasting blood glucose was reduced 15.2% in patients treated with *C. obtusifolia* phytopharmaceutical, while total cholesterol and triglycerides decreased by 14.6% and 42%, respectively. *Marrubium vulgare* decreased hyperglycemia by 0.6%, hypercholesterolemia by 4.2% and hypertriglyceridemia by 5.8%; no collateral effects were associated to both treatments.

For the obtained evidence, it is concluded that hypoglycemic effect of *C. obtusifolia* is due to a combined action of different chemical substances. Furthermore, phytopharmaceutical preparation is useful as adjunct therapy DM2 patients with poor metabolic control.

## I. INTRODUCCIÓN

Con el avance en el control de las enfermedades infecciosas en los últimos 30 años, las enfermedades crónicas no transmisibles representan el problema de salud más relevante en nuestros días. Entre éstas, las principales son las cardiovasculares y la diabetes mellitus (DM), las cuales ejercen un enorme impacto en la salud nacional e individual debido a su elevada incidencia y a la prematura morbilidad y mortalidad que ocasionan (Zimmet et al., 2001). El crecimiento mundial de la DM es de tipo epidémico y si bien afecta principalmente a individuos entre 40 y 60 años, existe un alarmante aumento de morbilidad en niños y adolescentes (Kaufman, 2002).

La medicina experimental ha iniciado una revaloración de las especies vegetales empleadas tradicionalmente por diversas poblaciones para el tratamiento de múltiples padecimientos. En México, de las más de 250 especies utilizadas para el tratamiento de la diabetes (Hernández-Galicia et al., 2002), *Cecropia obtusifolia* es una de las utilizadas con mayor frecuencia (Lozoya, et al., 1987; Hersch-Martínez, 1997). Por ello, la presente investigación tiene por objetivo el estudio farmacológico, fitoquímico y clínico de esta especie medicinal.

### 1.1 BREVE HISTORIA

Los primeros registros clínicos conocidos de la DM se encuentran en el papiro de Ebers y datan del año 1550 a.C. en Egipto. El término *diabetes* (pasar a través de un sifón) fue acuñado por el médico turco Arataeus de Cappadocia (81-133 d.C.) y está relacionado con la poliuria, él mismo definió a la diabetes como la enfermedad de las cuatro p's, poliuria, polifagia, polidipsia y poliastenia. Ya en la era moderna en el año

de 1675, el inglés Thomas Willis comentó que la orina de pacientes diabéticos era “*maravillosamente dulce, como embebida con miel o azúcar*”; el escocés William Cullen en 1750 agregó por ello *mellitus* (miel), aunque el dulzor de la orina fue reconocida en la India desde el siglo IV a.C., donde se describe a la enfermedad como “*madhummeda*”, o enfermedad de la orina de miel. Es hasta 1776 que Dobson (Inglaterra) demuestra la presencia de altas concentraciones de glucosa en sangre y orina de pacientes diabéticos, (Pyke, 1997; Ahmed, 2002; Hiriart, 2002; Patlak, 2002).

Claude Bernard (Francia) postula en 1857 que la diabetes resulta del exceso de producción de glucosa y que se relaciona con un aumento en la glucogénesis hepática. En 1869, un estudiante de medicina de apellido Langerhans (Alemania) describió la histología del páncreas y los islotes que llevan su nombre. La función endocrina del páncreas fue esclarecida hasta 1889 por von Mehring y Minkowski (Austria), en experimentos planeados para el estudio de la digestión. Este crucial hallazgo sirvió posteriormente como base para el aislamiento y purificación de la insulina, realizada por los canadienses Banting, su alumno Best y el químico Collip en 1921. En 1922 Banting y Best aceptaron la oferta de Eli-Lilly para iniciar la producción comercial de insulina para uso humano, cediendo los derechos a la Universidad de Toronto por un dólar (Pyke, 1997; Ahmed, 2002; Hiriart, 2002; Patlak, 2002).

Hacia 1958 se comercializaron los primeros agentes hipoglucemiantes no insulínicos, tolbutamida y carbutamida, aunque la segunda fue retirada debido a su neurotoxicidad. Desde 1922 Werner y Bell, dos químicos irlandeses, sintetizaron la dimetilbiguanida; si bien ésta y otros compuestos similares fueron rechazados

sistemáticamente por tóxicos, en 1959 Sterne (Francia) y Azerad estudiaron la metformina, que fue rápidamente comercializada en algunos países europeos y en 1995 en Norteamérica. Actualmente, se sabe que la resistencia a la insulina es quizás tan importante como su déficit relativo y por ello desde finales de los noventa se han comercializado tiazolidinedionas o glitazonas (drogas activadoras del PPAR  $\gamma$ ), como la troglitazona (marzo de 1997), rosiglitazona (mayo de 1999) y pioglitazona (julio de 1999), (Pyke, 1997; Ahmed, 2002; Hiriart, 2002; Patlak, 2002).

Para resaltar la importancia de la insulina, baste decir que fue una de las primeras proteínas cristalizadas (1926, Abel), la primera en secuenciarse (1945, Sanger), de las primeras que se conoció su conformación en el espacio (1955, Ryle) y la primera en sintetizarse por tecnología de ADN recombinante en el año de 1979 (Pyke, 1997; Ahmed, 2002; Hiriart, 2002; Patlak, 2002).

## **1.2 DEFINICIÓN DE DIABETES MELLITUS**

La diabetes mellitus (DM) incluye un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica generada por fallas en la secreción de insulina, en su acción, o ambas (The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

La hiperglucemia crónica condiciona el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares de carácter esencialmente irreversible (Donnelly et al., 2000). Estas complicaciones incluyen aterosclerosis, retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica con riesgo de úlceras y amputación de miembros inferiores, neuropatía del sistema nervioso autónomo con síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, así como disfunción sexual (The Expert Committee on Diagnosis

and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Dependiendo de su etiología la DM se ha clasificado en 4 principales grupos, como se menciona en la Tabla No. 1.

### **1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)**

Se caracteriza por la carencia de insulina debida a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, los genes involucrados se encuentran asociados con uno o ambos de los alelos de histocompatibilidad DR3 y DR4. Entre los marcadores celulares de autoinmunidad se han documentado anticuerpos contra: islotes (ICAs), insulina (IAAs), descarboxilasa del ácido glutámico ( $GAD_{65}$ ), y las tirosil fosfatasas (IA-2 y IA-2b). Uno o más de estos anticuerpos están presentes en el 85–90% de los pacientes cuando la hiperglucemia es diagnosticada. Este tipo de diabetes representa menos del 8% de los casos en el mundo, siendo Europa del Norte la región con la mayor morbilidad, hecho que podría deberse a una elevada predisposición genética o a un agente infeccioso (Güven y Kuenzi, 1998; Saladin, 1998; Kay et al., 2000).

### **1.2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2)**

Se caracteriza por una alteración en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, que incluye tanto secreción deficiente como resistencia a la insulina. Se encuentra relacionada estrechamente con el síndrome dismetabólico, el estilo de vida sedentario y el bajo peso al nacer (menor a 2.5 kg) (Reaven, 1988; Zimmet, 1999; Godfrey y Barker, 2000; Vickers et al., 2001), que son además los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. De modo opuesto a la morbilidad de la DM 1, la DM 2 es más prevalente en los grupos étnicos

**Tabla No.1** Clasificación etiológica de la DM (Guyen y Kuenzi, 1998; The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003 )

TIPO Y SUBTIPO	ETIOLOGÍA
<b>I. DM Tipo 1 (DM1)</b> Destrucción de células $\beta$ pancreáticas y ausencia de insulina. 1. Mediada por inmunidad 2. Idiopática	Destrucción autoinmune de células $\beta$ pancreáticas Desconocida
<b>II. DM Tipo 2 (DM2)</b> Caracterizada por resistencia a la insulina, ya sea por la deficiencia relativa o absoluta de ésta.	Desconocida
<b>III. Otros tipos específicos de diabetes</b> A. Defectos genéticos de la función de células $\beta$ , 1. Cromosoma 12, HNF-1 $\alpha$ (MODY3) 2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2) 3. Cromosoma 20, HNF-4 $\alpha$ (MODY1) B. Defectos genéticos en la acción de la insulina 1. Resistencia a la insulina Tipo A 2. Leprechaunismo 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall 4. Diabetes lipotrófica C. Enfermedades exócrinas del páncreas 1. Pancreatitis 2. Trauma o pancreatomectomía 3. Neoplasia 4. Fibrosis quística D. Endocrinopatías 1. Acromegalia 2. Síndrome de Cushing 3. Glucagonoma 4. Hipertiroidismo 5. Somatostinoma E. Inducida por químicos o iatrogénica 1. Vacor 2. Pentamida 3. Ácido nicotínico 4. Glucocorticoides 5. Hormona tiroidea 6. Diazóxido 7. Agonista $\beta$ adrenérgicos Bloqueadores $\beta$ adrenérgicos 8. Diuréticos tiazídicos 9. Fenitoína 10. $\alpha$ -interferón F. Infecciones 1. Rubéola congénita 2. Citomegalovirus, adenovirus y paramixovirus G. Formas no comunes de inmunomediadores de diabetes 1. Síndrome de "Stiff-man" 2. Anticuerpos antireceptor de insulina H. Otros síndromes asociados con diabetes 1. Síndrome de Down 2. Síndrome de Klinefelter 3. Síndrome de Turner	Regula la expresión de HNF-4 $\alpha$ ; en las células $\beta$ reduce la producción de insulina. Defecto en la señalización de insulina debido a fallas en la producción de glucocinasa. Factor de transcripción; en células $\beta$ disminuye la secreción de insulina promovida por glucosa. Mutación en el receptor de insulina Síndromes pediátricos con mutación en el receptor de insulina Defectos en la transducción de señal postreceptor Pérdida o destrucción de células $\beta$ Efectos diabéticos por exceso de producción hormonal Destrucción tóxica de células $\beta$ Destrucción tóxica de células $\beta$ Disminución en la acción de la insulina Incremento en la síntesis de glucosa; incremento en la RI Disminución en la acción de la insulina Disminución en la secreción de insulina Incremento en la producción de glucosa hepática Disminuyen sensibilidad y secreción de insulina Producción disminuida de insulina debido a pérdida de K <sup>+</sup> Inhibe la secreción de insulina Produce anticuerpos contra islotes Daño en células $\beta$ seguida por una reacción autoinmune. Enfermedad autoinmune del SNC con destrucción de células $\beta$ Destrucción del receptor de insulina Disminución de tolerancia a la glucosa asociada con anomalías cromosómicas
<b>IV. Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)</b> Cualquier grado de intolerancia a la glucosa con aparición durante el embarazo.	Combinación de resistencia a la insulina y disminución en la secreción de insulina

de origen racial distinto a los europeos; es así que las poblaciones originarias de Asia, Oceanía, África y América presentan mayor propensión para su desarrollo,

llegando incluso al 50% de incidencia en la República de Nauru y en poblaciones de nativos Pimas Norteamericanos (Diamond, 2003).

### **1.2.3 DM ASOCIADA A OTROS PADECIMIENTOS O SÍNDROMES**

Engloba la diabetes originada por causas diversas en las que el páncreas se ve dañado o comprometido e incluye diversos síndromes de origen genético (monogénico u oligogénico) e inmunológico (Tabla No. 1).

### **1.2.4 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL (DMG)**

Se denomina de esta forma a cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se desarrolle o aparezca durante el embarazo, independientemente del tratamiento aplicado a la paciente o del curso posterior. Es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de DM2, pues se estima que el 50% de las mujeres con DMG desarrolla el síndrome durante los siguientes 20 años (Hernández y Olaíz, 2002).

### **1.3 CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE DM**

Existen signos característicos para la identificación del padecimiento, sin embargo, se ha establecido a la determinación de glucemia en ayuno, por su facilidad, como la prueba diagnóstica por excelencia. A continuación se enumeran los parámetros aprobados hasta el momento en México según la NOM-015-SSA2-1994 (Terrés-Speziale, 2002).



- a) Poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso inexplicable, visión borrosa y concentración plasmática de glucosa > 200 mg/dl, en ayuno o sin él.
- b) Glucosa plasmática en ayuno > 126 mg/dl.
- c) En mujeres gestantes, cualquiera de las anteriores o glucemia > 200 mg/dl a las 2 horas de una prueba de tolerancia a la glucosa. La prueba deberá llevarse a cabo en el tercer trimestre de embarazo, con una carga de glucosa de 75 g.

#### **1.4 PATOGÉNESIS DE LA DM2**

La DM2 es una enfermedad con tres características principales: la resistencia periférica a la insulina, el incremento en la producción hepática de glucosa y la falla de las células  $\beta$  pancreáticas. La resistencia a la insulina precede y predice el desarrollo del síndrome, que se hace evidente al presentarse la falla en la secreción de insulina (Patti et al., 2003).

##### **1.4.1 RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)**

Se define como la disminución en la capacidad de respuesta de los tejidos blanco (adiposo, muscular esquelético y cardiaco, y parénquima hepático) a concentraciones fisiológicas de insulina. Si bien no se han definido con certeza sus causas, recientemente se ha revelado al tejido adiposo como un operador muy importante. El adipocito además de secretar ácidos grasos y glicerol, produce moléculas con actividad hormonal denominadas adipocitocinas (factor de necrosis

tumoral, leptina, adiponectina, resistina, etc.), las cuales se han asociado con el desarrollo de la RI.

Las causas moleculares de la RI no se han identificado con certeza, sin embargo, de acuerdo a un estudio realizado por los grupos de Kahn y Mandarino con pacientes mexicanoamericanos, tanto individuos de alto riesgo como pacientes diabéticos muestran una disminución en la expresión de PGC1  $\alpha$  y  $\beta$ , genes reguladores del metabolismo oxidativo y de la función mitocondrial. Los autores proponen que esta diferencia podría ser la responsable de las fallas metabólicas características de la RI y DM2 (Patti et al., 2003).

Otras condiciones que han sido identificadas, son los cambios en la expresión de la deshidrogenasa de 11-hidroxiesteroides, aumento del flujo metabólico en la vía de las hexosaminas y los gangliósidos y desarrollo de procesos inflamatorios en tejido adiposo (Saltiel y Khan, 2001). En pacientes con RI se han documentado defectos en la transducción de la señal de la insulina, en su expresión genética y en la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4).

En individuos de alto riesgo los defectos en la síntesis de glucógeno en músculo esquelético, así como el aumento en el almacenamiento de triglicéridos son detectados como eventos que preceden y predicen el desarrollo de la RI (Patti et al., 2003).

La generación por desactivación génica (*knockout*) de animales carentes de proteínas específicas de la vía de señalización de la insulina, ha dado idea de la complejidad de los mecanismos involucrados ya que la inactivación tejido-específico de genes no ha logrado explicar en su totalidad el fenómeno. En la Tabla No. 2 se

resume el papel de algunas mutaciones generadas y su efecto en los órganos blanco de la insulina y en la aparición de la DM.

**Tabla No. 2** Desactivación génica en ratones y su efecto sobre la RI y aparición de DM en ratones (Kadowaki, 2000)

Proteína eliminada	Respuesta a la insulina			Secreción de insulina	Fenotipo
	Músculo	Hígado	Tejido adiposo		
Receptor de insulina	Dañada	Dañada	Dañada	Hiperinsulinemia	Diabetes severa
Receptor de insulina en músculo	Dañada	Normal	Normal	Insulinemia normal	Síndrome dismetabólico
Receptor de insulina de células $\beta$	Normal	Normal	Normal	Disminución de respuesta a la glucosa. Masa normal de células $\beta$	Diabetes ligera
Receptor de insulina de hígado	Normal	Dañada	Normal	Hiperinsulinemia	Diabetes ligera
IRS-1	Disminuida	Normal	Disminuida	Hiperinsulinemia/hiperplasia de células $\beta$	Síndrome dismetabólico
IRS-2	Normal	Disminuida	Normal	Hiperinsulinemia/masa de células $\beta$ disminuida	Diabetes, de ligera a severa
IRS-3	Normal	Normal	Normal	Insulinemia normal	Aparentemente Normal

La sensibilidad a la insulina está determinada, aparentemente, por factores genéticos y epigenéticos. Los individuos con defectos genéticos en el receptor de insulina son escasos, pero representan las más severas formas de RI y están ejemplificados por el Leprechaunismo y el Síndrome de Rabson-Mendenhall (Tabla No. 1). De manera opuesta, la eliminación de los genes de las fosfatasa involucradas en la inactivación del receptor de insulina como PTP1B, LAR y SHIP2, aumentan la sensibilidad a la insulina (Elchebly et al., 1999; Klamann et al., 2000; Clement et al., 2001).

#### 1.4.2 INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN HEPÁTICA DE GLUCOSA

Con la participación de la insulina, el hígado regula la glucemia del organismo, controlando la captación, producción y liberación de glucosa al torrente sanguíneo, misma que es función del balance entre la glucogénesis, glucogenólisis y

gluconeogénesis. Entre las acciones de la insulina se encuentran la activación de la glucógeno sintasa, a través de la inhibición por desfosforilación de cinasas específicas, la activación de la proteína fosfatasa PP1 (Saltiel y Kahn, 2001) y la modulación de la proteína localizadora de glucógeno (PTG) (Crosson et al., 2003). Estas acciones provocan la inhibición de la glucógeno fosforilasa, responsable de la degradación de glucógeno. Asimismo, la insulina inhibe la producción de glucosa a partir de aminoácidos por mecanismos directos e indirectos. En la DM2 la acción de la insulina está alterada, de manera que el hígado contribuye activamente a la aparición de la hiperglucemia observada (Saltiel y Kahn, 2001).

#### **1.4.3 FALLA DE LAS CÉLULAS $\beta$**

La DM2 se hace evidente cuando las células  $\beta$  pancreáticas no pueden compensar la demanda de insulina ocasionada por la RI. Se ha propuesto que la concentración elevada de glucosa y ácidos grasos libres inducen la acumulación de triglicéridos en las células  $\beta$ . Esta alteración en la homeostasis metabólica eleva la tasa de apoptosis y disminuye el contenido y secreción de insulina. Estos mecanismos se han denominado gluco y lipotoxicidad. En la glucotoxicidad se han demostrado cambios en los patrones de expresión genética, así como incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno y productos de glucosilación avanzada (Poitout y Robertson, 2002).

En la lipotoxicidad, además de los niveles elevados de ácidos grasos libres, se han demostrado alteraciones en la vía de las ceramidas así como en las lipoproteínas plasmáticas, especialmente LDL. Estas condiciones ocasionan disminución en la

síntesis y secreción de insulina e inducen directamente apoptosis en las células  $\beta$  (Poitout y Robertson, 2002).

La hipótesis más reciente postula que el incremento en la producción mitocondrial de radicales superóxido aumenta los niveles de la forma activada de la proteína desacoplante 2 (UCP2) e inhibe la secreción de insulina (Krauss et al., 2003).

## 1.5 FACTORES DE RIESGO

Existen diferentes condiciones que incrementan el riesgo para el desarrollo de DM2, estas se pueden dividir en hereditarias y ambientales. Algunos estudios muestran la alta concordancia intrafamiliar, siendo del 15% entre parientes de segundo grado, 35% en los de primer grado y prácticamente del 100% en gemelos monocigóticos (Cruz et al., 2002). Además, se han identificado y estudiado grupos étnicos con elevada propensión al desarrollo de DM2, como los nativos americanos, australianos, asiáticos, africanos e isleños de la Cuenca del Pacífico.

Entre los factores ambientales y de estilo de vida determinantes, se encuentran la desnutrición *in utero* y el bajo peso al nacer (menor a 2.5 Kg), sobrepeso (IMC mayor a 25) y obesidad central (IMC mayor a 30 con depósitos grasos predominantemente abdominales), síndrome dismetabólico (hipertensión, dislipidemia, sobrepeso u obesidad), sedentarismo, y dieta rica en grasas saturadas y baja en frutas y verduras (Hernández y Olaíz, 2002).

Se ha demostrado que la exposición a un estilo de vida urbano en individuos con alta predisposición genética incrementa la probabilidad para el desarrollo de DM2, como lo demuestra la observación de poblaciones emigrantes en Japón y los EUA (Diamond, 2003).

En contraste, se ha demostrado en estudios a largo plazo que los individuos con alto riesgo a desarrollar DM2 pueden disminuir o retrasar su aparición de manera contundente al modificar la dieta e incrementar el ejercicio (Diabetes Prevention Program Research Group, 2002).

## **1.6 SECRECIÓN DE LA INSULINA**

Al elevarse la concentración de glucosa en plasma, ésta es introducida a las células  $\beta$  del páncreas por el transportador GLUT2 y oxidada vía glucólisis y ciclo de Krebs. El consecuente incremento en la relación ATP/ADP cierra los canales de  $K^+$  sensibles a ATP y activa corrientes catiónicas no selectivas que aumentan la despolarización de la membrana. Posteriormente, se activan los canales de  $Ca^{++}$  sensibles a voltaje, lo cual incrementa la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular y estimula finalmente el tráfico y la fusión de vesículas a la membrana plasmática, produciendo exocitosis pulsátil de insulina (Huopio, 2002).

En el ser humano, después de la ingesta de glucosa, ocurre una primera fase de secreción con un pico máximo de 1 a 5 minutos, en donde se libera la insulina almacenada, seguida por una segunda fase de producción y liberación de proteína, que inicia a los 2 minutos y va incrementándose lentamente hasta los 60 minutos o cuando cesa el estímulo. La insulina libre tiene una vida media de 5 minutos, la unida a proteínas transportadoras se elimina entre 10 y 15 minutos principalmente en hígado, riñón y músculo. (Güven y Kuenzi, 1998; White et al. 2003).

### 1.6.1 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA INSULINA

La insulina es la hormona anabólica más activa, incrementa el transporte de glucosa en adipocitos, músculo e hígado, regula el metabolismo de lípidos y proteínas y participa de manera importante en eventos de diferenciación y crecimiento celular (Pessin y Saltiel, 2000), para ejercer estas acciones se requiere su unión con receptores de membrana.

El receptor de la insulina es una glicoproteína conformado por 4 subunidades unidas por enlaces disulfuro, dos subunidades  $\alpha$  situadas en la parte externa de la membrana que contienen el dominio de unión a la hormona y 2 subunidades  $\beta$  transmembranales con actividad tirosil cinasa (Güven y Kuenzi, 1998). La unión de la insulina a las subunidades  $\alpha$  desencadena la actividad de tirosil cinasa de las subunidades  $\beta$ , produciendo autofosforilación en residuos específicos de tirosina, que a su vez promueven el inicio de la cascada de fosforilación de proteínas accesorias y de los sustratos IRS1-4 (Saltiel, 2001). La señalización prosigue por dos vías principales, la relacionada con los inositol trifosfatos y la que involucra a las proteínas ras, raf, MEK y MAPK. De estas vías se derivan la regulación de la síntesis proteínica, el incremento del transporte de glucosa (por el aumento del tráfico de GLUT4), la regulación de la síntesis de glucógeno y la sobrevivencia celular promovidas por la insulina (White, 2002).

El avance en el entendimiento de los eventos intracelulares relacionados con la acción de la insulina hará posible la comprensión de la patofisiología de la DM2 y de la RI.

## 1.7 EPIDEMIOLOGÍA

En el año 2000, se calculó que la población diabética diagnosticada en el mundo ascendía a 171 millones de personas (Wild et al., 2004). De continuar la tendencia actual, para el año 2030 la cifra superará los 366 millones (Wild et al., 2004) y los países en vías de desarrollo contribuirán con el 60% de los casos (Zimmet et al., 2001).

De acuerdo con la OMS, en América Latina y el Caribe en el año 2000, los costos directos estimados para el tratamiento de la DM2 (fármacos y atención médica), correspondieron a US\$ 10,721 millones. Si se suman además los US\$ 54,496 millones calculados por costos indirectos (pérdida de salarios por mortalidad y discapacidad), el costo total sería de US\$ 65,216 millones (Barceló et al., 2003).

En México, debido al aumento en la exposición a factores de riesgo, la morbilidad por diabetes aumentó más de 30 veces en los últimos 50 años, hasta ocupar en el 2001 el primer lugar de la mortalidad en adultos (Aguilar-Salinas et al., 2003). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud (Velásquez et al., 2002), 10.9% de la población mexicana entre 20 y 69 años padece diabetes y cerca de 23% de los afectados desconoce que la tiene. Esto significa que en nuestro país existen aproximadamente cinco millones de personas diabéticas, de las cuales más de un millón no han sido diagnosticadas (Velásquez et al., 2002). El IMSS calcula que el costo asociado únicamente por el tratamiento y la incapacidad generada por este padecimiento, supera los US \$400 millones al año. Sumando a éstos los costos del resto de la población, se puede afirmar que las cifras anuales son superiores a los US \$1,000 millones, lo cual evidentemente se traduce en un impacto económico y social relevante (Alpízar, 1999; Hernández y Olaíz, 2002).



Los adultos con DM2 tienen una mortalidad anual del 5.4%, cifra que representa el doble de la de personas no diabéticas, reduciéndose además la expectativa de vida de 5 a 10 años (Donnelly et al., 2000). Asimismo, las complicaciones micro y macrovasculares llevan a algún grado de incapacidad y consecuentemente deterioran la calidad de vida. El 14% de los pacientes diabéticos desarrolla insuficiencia renal crónica, 10% neuropatía motriz, sensitiva y autonómica, 10% pie diabético (un tercio de los cuales terminará en amputación) y de 2 a 5% ceguera. En los pacientes diabéticos las alteraciones del metabolismo de lípidos generan en algún momento, hipertensión, aterosclerosis y dislipidemia, lo cual eleva la incidencia de cardio y vasculopatías (Hernández y Olaíz, 2002).

## **1.8 TRATAMIENTO**

### **1.8.1 TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO**

Esta intervención se refiere a cambios en el estilo de vida que comprenden dos grandes áreas. La primera es la adecuación de la dieta: baja en carbohidratos y grasas saturadas, normal en proteínas, además de la incorporación de productos naturales ricos en fibra (soluble e insoluble), antioxidantes y atrapadores de radicales libres. La segunda es el ejercicio físico equilibrado, que promueve cambios desde la expresión génica hasta la fisiología del organismo completo. Se ha descrito que la actividad física moderada (definida como aquella que eleva entre el 50 y 70% la frecuencia cardíaca máxima), incrementa la expresión de los transportadores de glucosa y la expresión de la lipasa lipoprotéica, enzima que cataliza la degradación de triglicéridos (Withers et al., 1998).

La actividad física se asocia con una mejora en la tolerancia a la glucosa *in vivo* (Khan, 1996) y con incremento en la microvascularización muscular. Existe creciente evidencia de que una rutina de ejercicio vigoroso (entre el 70% y el 80% de la frecuencia cardíaca máxima), debe ser adoptada por individuos con intolerancia a la glucosa y por pacientes con DM2, en ausencia de complicaciones. Esta medida revierte y estabiliza el deterioro metabólico (Wright y Swan, 2001).

El hecho más relevante con respecto a un programa de control de peso, adecuación de la dieta y ejercicio, es la total demostración de que previenen y retrasan el desarrollo de la DM2 en un alto porcentaje de individuos de alto riesgo (Tuomilehto et al., 2001; Diabetes Prevention Program Research Group, 2002).

### 1.8.2 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Desde el primer registro histórico de la DM2, hace 3500 años, se han ensayado para su control diferentes esquemas terapéuticos. Sin embargo, sólo en los últimos 50 años se han descubierto las bases moleculares de los fármacos empleados por la medicina occidental de nuestros días.

Los medicamentos antidiabéticos se pueden agrupar de acuerdo a su estructura química, como se resume en la Tabla No. 3.

- a) Sulfonilureas.** En las células  $\beta$ , se unen a la subunidad SUR1 del canal de  $K^+$  sensible a ATP (encargada de la activación y la regulación del canal). La unión de estos ligandos al receptor origina el cierre del canal, la despolarización de la célula, y en una reacción acoplada al flujo de  $Ca^{++}$ , la secreción de insulina (Aguilar-Bryan, 1998). El uso de estos

fármacos conlleva el riesgo de episodios hipoglucémicos, sobre todo las de vida media mayor como clorpropamida y glibenclamida. No ejercen efecto sobre la RI, por el contrario, producen hiperinsulinemia y ganancia de peso (Campbell, 2000). El 75% de personas tratadas con estos compuestos no controlan su hiperglucemia (Weissman, 2002). Además, de acuerdo con Saltiel (2001), su uso ha sido asociado con la falla prematura de células  $\beta$ .

**Tabla No. 3** Tratamientos farmacológicos disponibles para el tratamiento de la DM2

FÁRMACO	ACCIÓN PRINCIPAL	EJEMPLOS
Sulfonilureas	Actúan directamente en las células $\beta$ pancreáticas, promoviendo la secreción de insulina.	Tolbutamida, Glibenclamida, Glimepirida, Glipizida, Gliburida.
Análogos de Meglitinida	Poseen el mismo efecto que las sulfonilureas. Su efecto es más rápido y su vida media menor.	Repaglinida, Nateglinida
Biguanidas	Disminuyen la gluconeogénesis hepática. Favorecen la utilización de glucosa, principalmente en músculo.	Metformina
Inhibidores de $\alpha$ glucosidasas	Agonistas competitivos de glucosidasas intestinales.	Miglitol, Acarbosa, Voglibosa
Tiazolidinedionas	Aumentan la eficiencia de la respuesta a la insulina.	Rosiglitazona, Pioglitazona
Insulina y análogos	Aumenta la utilización periférica de glucosa.	No modificada, NPH, Lenta, Ultralenta (Humana, Porcina, Bovina)

**b) Análogos de Meglitinida.** Se trata, como las sulfonilureas, de fármacos secretagogos; su mayor valor terapéutico es la corta duración de su efecto, lo cual disminuye el riesgo de hipoglucemia (Chehade y Mooradian, 2000; Scheen, 2003).

**c) Biguanidas.** Estos fármacos inhiben la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática e incrementan la sensibilidad periférica a la

acción de la insulina. Protegen a las células  $\beta$  de la apoptosis y previenen el desarrollo de la DM2 en un 31% de individuos altamente susceptibles. Por su efecto anorexigénico son recomendables en pacientes diabéticos obesos, reduciendo las complicaciones cardiovasculares. Entre los efectos adversos se encuentran la acidosis láctica, náuseas, molestias abdominales como diarrea y disminución en la absorción de vitamina B<sub>12</sub>. (Chehade y Mooradian, 2000; Diabetes Prevention Program Research Group, 2002; Scheen, 2003).

**d) Inhibidores de  $\alpha$  glucosidasas (IAG).** Estas moléculas son inhibidores competitivos y reversibles de las enzimas responsables de la digestión de los carbohidratos de alto peso molecular, por lo tanto, suprimen o retardan su hidrólisis y absorción en el intestino. Es importante resaltar que la importancia de estas moléculas va más allá de la simple inhibición de las enzimas intestinales; por ejemplo, la acarbosa atenúa la elevación postprandial del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), del enteroglucagón y del péptido YY (PYY) por otro lado, aumenta el péptido similar al glucagón (GLP-1). Estas acciones retrasan el vaciado gástrico y la secreción de ácido clorhídrico, aumentando la sensación de saciedad (Enç et al., 2001). El principal beneficio de la terapia con estos compuestos es disminuir la hiperglucemia postprandial, importante factor para la progresión de las complicaciones asociadas (Chehade y Mooradian, 2000).

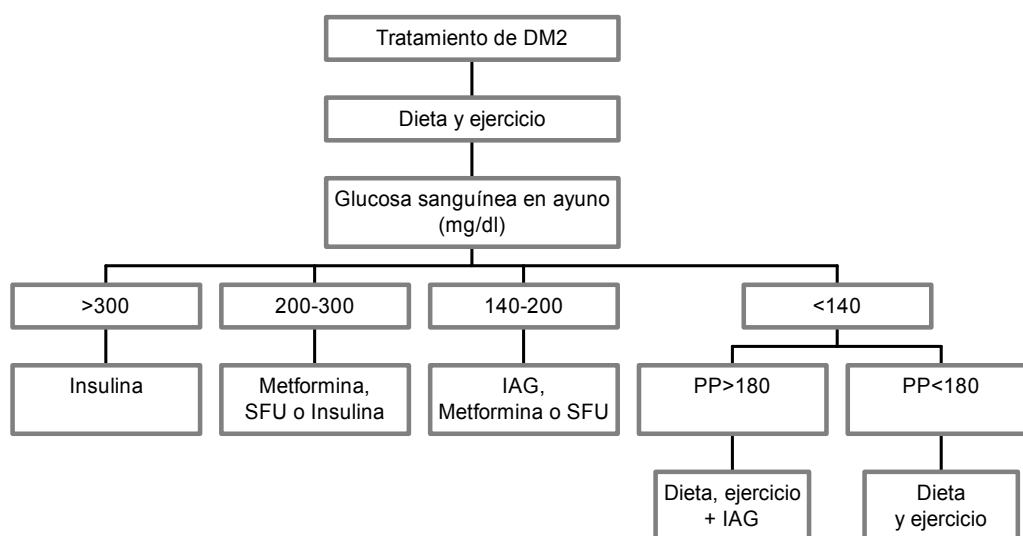
**e) Tiazolidinedionas.** Lanzadas al mercado en la década de los 90, este grupo constituye la más reciente anexión a la terapia de la DM2, únicas que combaten de manera directa la RI. Su mayor efecto terapéutico es aumentar la sensibilidad a la insulina en músculo, hígado y tejido adiposo. Actúan sobre el receptor activado por el proliferador de peroxisomas tipo  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ). La estimulación de los PPAR  $\gamma$  incrementa la expresión de GLUT4, lipasa lipoprotéica, acilcoenzima A sintasa y las enzimas málicas. En el adipocito, disminuyen la producción de ácidos grasos libres, leptina y TNF  $\alpha$ , moléculas que promueven la resistencia a la insulina (Martens et al., 2002).

Los efectos celulares de esta familia comprenden la estimulación de la maduración de los adipocitos y la redistribución del tejido adiposo, favoreciendo los depósitos subcutáneos y disminuyendo la grasa visceral, hepática y muscular (Scheen, 2003); reducen también diversos factores de riesgo cardiovascular. Entre los efectos adversos se encuentran incremento de peso, retención de líquidos y edema (Diamant y Heine, 2003).

**f) Insulina.** Pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad generalmente progresan a una deficiencia de insulina endógena, siendo absolutamente necesaria su administración. La terapia con insulina está indicada además en aquellas personas en las que otros tratamientos farmacológicos han fallado o representan un riesgo para la salud, debido a trastornos renales o hepáticos. Recientemente se ha postulado que la

prescripción de insulina en etapas tempranas podría retrasar la progresión de la disfunción de las células  $\beta$  (White et al., 2003). La insulina disponible actualmente es de origen animal altamente purificada o humana obtenida por tecnología de ADN recombinante (Chehade y Mooradian, 2000; Scheen, 2003).

El tratamiento del paciente diabético debe ser ajustado de acuerdo a criterios diversos con base en las características particulares de cada caso. En la Fig. No. 1 se esbozan, tomando como referencia la glucemia, diferentes alternativas de tratamiento, según la condición inicial y su respuesta a la intervención terapéutica.



**Figura No. 1** Algoritmo de decisión terapéutica, basado en la glucemia en ayuno. IAG= Inhibidor  $\alpha$  glucosidasas, PP= postprandio (1 hora), SFU= Sulfonilureas (Chehade y Mooradian, 2000).

De forma paralela a la terapia farmacológica, que no ha logrado resolver ni detener la evolución del síndrome, en todo el mundo se recurre a terapias alternativas, entre las que destaca particularmente el uso de especies vegetales como coadyuvantes o

única opción para el tratamiento de la DM2. En México se estima que un 63% de los pacientes diabéticos emplean terapias alternativas además del tratamiento convencional, aunque sin el seguimiento de un profesional de la salud (Argáez-López et al., 2003).

## **1.9 ESPECIES VEGETALES UTILIZADAS PARA EL TRATAMIENTO DE DM2 Y SUS COMPLICACIONES**

Todas las medicinas, incluyendo las indígenas y la científica, son un conjunto ordenado de ideas, conocimientos y prácticas con las que cada pueblo entiende la salud, la enfermedad, el dolor y la muerte; elementos con los que actúan con el fin de prevenir la enfermedad, aliviar el dolor, restituir la salud y prolongar la vida.

La farmacéutica moderna reconoce a las plantas como fuente importante de moléculas bioactivas para el desarrollo de medicamentos. Un ejemplo del éxito de este enfoque es el hecho que de los 20 fármacos no proteínicos más comercializados, 9 fueron desarrollados a partir de esta fuente; entre éstos se encuentran estatinas, fluoroquinolonas, claritromicina, ciclosporina, ácido clavulánico y enalapril, por nombrar algunos. La diversidad de metabolitos secundarios encontrados en las plantas es muy elevada y superior a la ofrecida por cualquier otra fuente, incluyendo la química combinatoria (Harvey, 2000).

El vasto conocimiento de la medicina tradicional de diversos países, entre los que destacan por su antigüedad y riqueza cultural China, la India y México, se ha recopilado por la etnomedicina y ha servido como una de las estrategias más efectivas para el desarrollo de medicamentos con actividad terapéutica novedosa.

De acuerdo con Farnsworth (1993), 60% de la población mundial depende casi exclusivamente de remedios herbolarios para cubrir sus necesidades de medicamentos.

La información etnobotánica a lo largo del mundo acerca de los remedios utilizados para el manejo de la DM2 incluye más de 1200 especies vegetales. En México, según un reporte del herbario IMSSM, existen 179 registros de especies pertenecientes a 68 familias, de las cuales Asteraceae, Cactaceae y Fabaceae son las más importantes (Aguilar y Xolalpa, 2002). De acuerdo a otro reporte en el que recopila la información del herbario IMSSM, además de los datos de una encuesta nacional (IMSS-COPLAMAR 1983-1985), información contenida en revistas indizadas y tesis diversas; en nuestro país existen 269 diferentes especies utilizadas empíricamente para el manejo de la DM (Hernández-Galicia et al., 2002).

Una gran cantidad de las especies con atribuida actividad hipoglucemiante en el mundo han sido evaluadas experimentalmente, sin embargo, se han identificado agentes hipoglucemiantes potenciales en tan sólo 100 de éstas (Ling-Hua y Pei-Gen, 1993). Los compuestos químicos identificados corresponden principalmente a glicanos, proteínas y mucílagos; y en menor proporción a flavonoides, esteroides, triterpenos y alcaloides (Pérez et. al., 1998). Por otro lado, sólo un limitado conjunto ha sido abordado desde el punto de vista fitoquímico, farmacológico y clínico.

Con base en los reportes de la actividad hipoglucemiante de *Cecropia obtusifolia* en modelos animales y al hecho de ser una de las especies con mayor uso en la práctica médica tradicional no sólo en nuestro país, sino en Centro y Sudamérica para el tratamiento de la DM2, se consideró interesante abordar el estudio fitoquímico, farmacológico y clínico de la especie.



## II. ANTECEDENTES *Cecropia obtusifolia* Bertol.

### 2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida

Orden: Urticales

Familia: Moraceae (Cecropiaceae)

Género: *Cecropia*

Especie: *obtusifolia*

### 2.2 SINONIMIA BOTÁNICA

*Cecropia burriada* Cuatrec., *Cecropia mexicana* Hemsl., *Cecropia mexicana* variedad *macrostachya* Donn. Sm., *Cecropia obtusifolia* subespecie *burriada* (Cuatrec.) C.C. Berg & P. Franco, *Cecropia panamensis* Hemsl., *Cecropia asperrima* Pittier, *Cecropia amphichlora* Standl. & L.O. Williams, *Cecropia levyana* V.A. Richt (Missouri Botanical Garden, 2003).

#### 2.2.1 SINONIMIA POPULAR

Dependiendo de la región donde crece, *C. obtusifolia* recibe diferentes nombres comunes: i'tó yyá (el hueco o el sordo), palo de hormigas, trompetillo (Veracruz, Oaxaca); tsulte, juaquequistli, quiquiscuahuitl, jarilla y palo de violín (San Luis Potosí); trompeta (Sinaloa); coilotópalo (Distrito Federal); chancarro (Veracruz, Oaxaca); hormigo y aqoj (Veracruz); hormigo, hormiguillo, akowa, guarumbo y

azcatcuauhit (Puebla); piconi (Hidalgo), trompeto y guarumbo (Guerrero), guarina (Tabasco); guarumo, guarina, c'oloc' (Chiapas); k'axxixkooch, k'ooch y kkoochle' (Quintana-Roo); k'aaxi, k'aaxil, k'o'ochle', k'o'chte, xk'o'och y xk'ochle (Yucatán); sarumo y trompeto (Michoacán); shushanguji (Veracruz); huitapil (Jalisco); yaba, yabioo, yava, yaga-gacho, guarumbo y joot (Oaxaca), (Ortiz, 2003).

### 2.3 DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT

La especie es originaria de América Central, se distribuye desde México hasta el norte de Sudamérica. Habita en climas cálido, semicálido y templado, desde el nivel del mar hasta los 1500 m. Se le encuentra exclusivamente a lo largo de caminos plenamente iluminados. Crece como vegetación secundaria en sitios perturbados, derivados de selvas tropicales (caducifolia, subcaducifolia, subperennifolia o perennifolia). En ocasiones se asocia con matorral xerófilo de cactáceas o cedros, en pastizal y bosque mixto de encino-pino. Se desarrolla en suelos de origen volcánico, calizo, sedimentario o metamórfico; con buen drenaje o con problemas de empantanamiento.

En México *C. obtusifolia* se distribuye ampliamente: en la vertiente del Golfo, desde Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Yucatán y Quintana Roo y en la zona del pacífico, desde Sinaloa hacia Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; en la zona centro la encontramos en Puebla, Hidalgo y Guanajuato ([SEMARNAT](#), 2003) (Fig. No. 2).



**Figura No. 2** Distribución de *Cecropia obtusifolia* en la República Mexicana

## 2.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

*C. obtusifolia* es un árbol que mide de 15 a 35 m de altura (Fig. No. 3). El tronco monopódico, cilíndrico, recto y hueco en el centro (Fig. No. 4), normalmente se encuentra habitado por hormigas del género *Azteca*.



**Figura No. 3** *Cecropia obtusifolia*, árbol silvestre

La corteza externa es gris clara, lisa, con lenticelas negras dispuestas en líneas longitudinales. La corteza interna es de color crema verdoso o crema claro, cambiando a pardo oscuro, produce un exudado que se torna negro al contacto con el aire. Presenta reversión juvenil, por lo que las hojas son lanceoladas durante las primeras etapas del desarrollo y se tornan lobuladas posteriormente. En la parte basal de cada pecíolo presenta estructuras llamadas trichilias, en las que se generan corpúsculos blancos denominados cuerpos Müllerianos. Estos cuerpos son estructuras multicelulares ovoides, lanosas, que las hormigas constantemente remueven con fines alimentarios ([SEMARNAT](#), 2003).

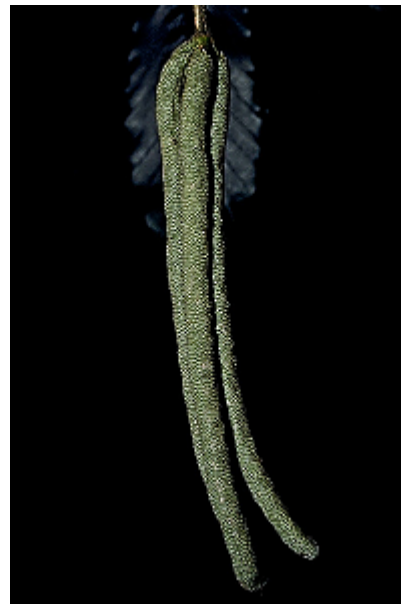
*C. obtusifolia* es una especie dioica, las inflorescencias masculinas (Fig. No. 5) se agrupan de 12 a 18 espigas, con un pedúnculo común que emerge de una espata. Las inflorescencias femeninas (Fig. No. 6) tienen un pedúnculo común, esparcidamente pubérulo con pelos delgados y blanquecinos, llevando por lo común 3-6 espigas protegidas por una espata. Las espigas fructíferas (femeninas) presentan un fruto de 2 mm de largo y de 1.2 mm de ancho, con frecuencia aplanado .



**Figura No. 4** *Cecropia obtusifolia*, tronco y pecíolos con cuerpos Müllerianos



**Figura No. 5** Inflorescencia masculina



**Figura No. 6** Inflorescencia femenina

La infrutescencia es de color verde amarillento a pardo oscuro. Contiene de 2,700 a 4,700 aquenios de tono marrón brillante, muy pequeños, con una semilla cada uno, de sabor parecido al higo. Sus semillas son de 1 a 2.8 mm de largo y 0.8 a 1.3 mm de ancho, cilíndricas y con aspecto pardo brillante (Fig. No. 7), ([SEMARNAT](#), 2003).



**Figura No. 7** Semillas de *Cecropia obtusifolia*

## 2.5 ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Cada árbol presenta un promedio de 81 infrutescencias, formadas a su vez por 3 ó 5 espigas. Se estima que cada espiga produce de 2,700 a 4,700 semillas (11,168 semillas por infrutescencia y un total de 900,141 semillas por árbol). Las semillas son dispersadas por aves locales o migratorias, murciélagos frugívoros, mamíferos, marsupiales o roedores. De la simiente producida en un año, solamente el 40% llega al suelo y de ésta, únicamente la mitad es viable. La edad promedio de una semilla en el suelo es de 7 días con una viabilidad inicial del 90%, la cual van perdiendo al pasar el tiempo ([SEMARNAT, 2003](#)).

## 2.6 MANEJO

Considerando la dominancia de *Cecropia obtusifolia* en las áreas cubiertas de vegetación secundaria en el trópico húmedo mexicano y el gran número de individuos de esta especie que constituyen a los acahuales; el forraje de esta especie perennifolia proporciona durante la época de sequía uno más de los forrajes frescos y verdes que el ganado puede consumir en el Sureste mexicano. Tales regiones han perdido su cobertura original y se encuentran cubiertos de vegetación secundaria en diferentes etapas de desarrollo. Esta situación abre importantes perspectivas para la especie, que había sido considerada hasta hace poco de escasa utilidad. Su aprovechamiento está regulado por la Secretaría del Medio Ambiente ([SEMARNAT, 2003](#)).

## 2.7 USOS MEDICINALES

Se emplea en la medicina popular con propósitos diversos, como antitusivo, antipirético, diurético; en afecciones nerviosas, cardíacas, hepáticas, pulmonares y renales; para el tratamiento de asma, resfriado común, heridas, fracturas, reuma y obesidad.

Para malestares de presión arterial y para tratar problemas renales es recomendada la ingestión del cocimiento de esta planta en ayuno, por lo menos durante una semana. También recibe amplio uso contra picaduras de alacrán y hormigas, para lo cual debe lavarse la parte afectada con el cocimiento de las hojas, previamente endulzado con miel de abeja. En casos de verrugas se aplica directo el látex. Para quemaduras se recomienda aplicar baños, fomentos o cataplasmas de las hojas molidas con aceite mineral o hervidas con sal.

El uso medicinal más reportado para *C. obtusifolia*, desde el centro hasta el sureste del país, es como coadyuvante o único remedio en casos de diabetes, donde el tratamiento consiste en emplear la infusión de las hojas, ramas, corteza o raíz como agua de uso. En el caso de las hojas, se recomienda hervir 3 ó 4 tiernas en 2 litros de agua (Argueta, 1994; Gupta, 1995; Ortiz, 2003).

## 2.8 FARMACOLOGÍA

La actividad hipoglucemiante de *C. obtusifolia* ha sido evaluada en diferentes modelos biológicos. Se ha descrito la actividad hipoglucemiante del extracto acuoso, administrado p.o. e i.p., en animales sanos durante una curva de tolerancia y en animales con diabetes inducida por la administración de aloxana (Pérez et. al., 1984;

Román-Ramos et. al., 1991) también se ha descrito actividad hipotensora en ratas después de la administración i.v. de 50 mg/kg (Vidrio, 1982).

Para evaluar el efecto del extracto acuoso de las hojas, sobre la fisiología animal, se hizo un estudio con perros mongrel sanos y con pancreatectomía parcial o total. La administración i.v. del extracto de *C. obtusifolia* (15 mg/kg referido a la planta seca) disminuyó la glucemia a las dos horas de su administración; el efecto más notorio se presentó a las cuatro horas. La glucemia en los animales sanos disminuyó un 33% y en los pancreatectomizados un 46%. Por el contrario, la concentración de triglicéridos aumentó en los animales sanos en un 58%; en aquellos pancreatectomizados parcialmente disminuyó un 54% y en los animales sin páncreas un 43%. Dado que los animales a los que se extrajo totalmente el páncreas, después de un reto con glucosa 1 hora después de la cirugía, no disminuyeron su glucemia, se concluyó que el efecto hipoglucémico de *C. obtusifolia* no es insulinomimético y que probablemente estuviera relacionado con la estimulación de células  $\beta$  pancreáticas (Mellado y Lozoya, 1984).

En un estudio con conejos sanos, se evaluó el extracto acuoso después de la administración de glucosa en una dosis de 2 g/kg de peso corporal. La glucemia del grupo tratado por vía oral con *C. obtusifolia* disminuyó un 17.6% con respecto al control dos horas después de iniciado el reto (Román-Ramos et al., 1992).

Pérez Guerrero y su grupo (2001), administraron intraperitonealmente 250 mg/kg de un extracto acuoso, induciendo mayor efecto analgésico que 200 mg/kg de metamizol, también se inhibieron las dos fases de la respuesta a la formalina y se obtuvieron diferencias significativas a partir de la dosis de 50 mg/kg en la prueba del ácido acético, siendo las dosis de 250 y 500 mg/kg significativamente más efectivos



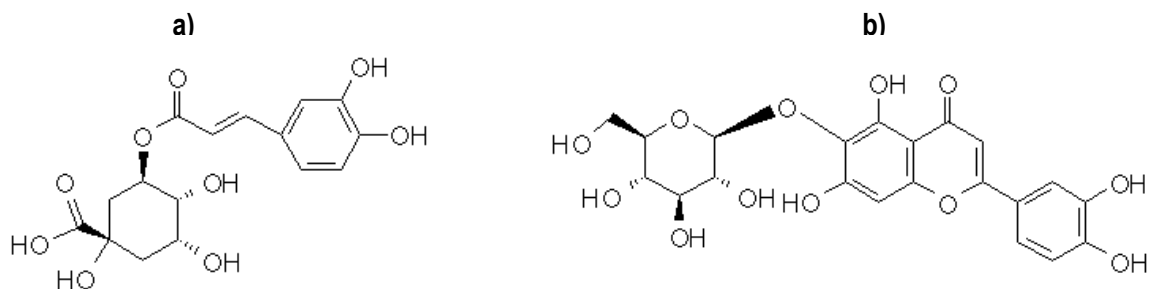
que metamizol; tales resultados sugieren un efecto analgésico periférico. Se probó asimismo la actividad del extracto acuoso administrado intraperitonealmente en diversas pruebas etológicas para evaluar la actividad sobre SNC, estableciéndose un ligero efecto depresor reflejado por la respuesta positiva a las pruebas de “hole board”, “rota rod”, evasión y tracción. Se estableció también que la especie posee actividad antiinflamatoria sistémica y tópica, el grupo propone que tal actividad se debe a la interferencia en la síntesis o liberación de mediadores de la respuesta inflamatoria, como histamina y prostaglandinas (Pérez-Guerrero et al., 2001).

Se ha demostrado también que los extractos acuoso y metanólico tienen la capacidad de unirse al receptor AT<sub>1</sub> de la angiotensina II ([<sup>3</sup>H] -AT II), (Caballero-George et al., 2001), con lo que se explica su uso como antihipertensivo.

Con la finalidad de purificar y caracterizar los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante, se hizo un estudio químico-biológico con ratas Wistar (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001). El extracto acuoso derivado de las hojas de *C. obtusifolia* fue sometido a una separación líquido/líquido con n-butanol (Bu-OH). La fracción butanólica fue separada por cromatografía en columna y las fracciones obtenidas, analizadas por HPLC. Los compuestos mayoritarios separados correspondieron al ácido clorogénico (AC) e isoorientina (Fig. No. 8).

Los extractos acuoso y butanólico, así como los compuestos puros, fueron administrados a diferentes grupos de ratas pretratadas con estreptozotocina (STZ). El extracto acuoso administrado oralmente en dosis de 90 y 150 mg/kg, redujo la concentración plasmática de glucosa en un 15.1% y 15.7%, respectivamente. Por su parte, 9 mg/kg de extracto butanólico disminuyeron un 16.1% la glucemia y un 15.2% con la dosis de 15 mg/kg, utilizando el mismo modelo. El AC y la isoorientina,

compuestos mayoritarios aislados de esta especie, dosificados a 10 mg/kg de peso disminuyeron 25.7 y 27.1 puntos porcentuales la concentración de glucosa, (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001).



**Figura No. 8** Compuestos con actividad hipoglucemiante en *C. obtusifolia*: a) Ácido clorogénico, b) isoorientina (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001).

### 2.8.1 TOXICIDAD

El extracto acuoso liofilizado de las hojas provocó taquicardia en ratas al administrarse por vía intravenosa a dosis de 10 mg/kg (Argueta, 1994). La administración i.p. del extracto acuoso en ratas Swiss mostró una  $DL_{50}$  de  $1.5 \pm 0.7$  g/kg (Pérez-Guerrero et al., 2001).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM2 es uno de los principales problemas de salud mundial, mostrando un comportamiento de tipo epidémico cuyo ascenso continúa. El incremento en la incidencia se asocia con el sedentarismo y la obesidad propiciados por los cambios en el estilo de vida y los hábitos alimentarios modernos (Zimmet et al., 2001).

La población mexicana posee una alta predisposición para el desarrollo de este síndrome. Se estima que la prevalencia nacional en personas mayores de 20 años es del 11.6%; se relaciona directamente con la edad de manera que en la población mayor de 50 años es superior al 20% (Velázquez et al., 2002). Uno de los aspectos más importantes a considerar es que el paciente diabético disminuye su calidad y expectativa de vida debido al desarrollo de las diversas complicaciones micro y macrovasculares.

Los fármacos actualmente disponibles para el control de la DM2 no logran prevenir o revertir el desarrollo de la enfermedad ni retrasar, en general, la aparición de complicaciones; existiendo por lo tanto la urgente necesidad del desarrollo de fármacos o sustancias que brinden un esquema terapéutico alternativo a los ya existentes (Moller, 2001).

Una opción interesante para la búsqueda de moléculas con actividad farmacológica novedosa es la flora utilizada de manera tradicional con fines medicinales. En pleno siglo XXI, diversos grupos humanos utilizan remedios herbolarios como coadyuvantes o como único recurso para el tratamiento de los pacientes diabéticos en todo el mundo, lo cual ha motivado la realización de estudios experimentales y

clínicos para evaluar la actividad hipoglucemiante y antihiperoglucemiante de extractos vegetales o de compuestos aislados de éstos.

La infusión de las hojas de *C. obtusifolia*, comúnmente conocido como guarumbo, es utilizada vernáculamente en nuestro país como hipoglucemiante. Esta propiedad biológica ha sido corroborada en diferentes modelos experimentales, asimismo se han reportado dos compuestos como los responsables de la actividad hipoglucemiante, sin embargo, su actividad es menor a la de los extractos originales. Es posible que en la porción activa del extracto, además del AC y la isoorientina descritos, otros constituyentes posean o sean importantes para ejercer el efecto hipoglucémico.

Se ha documentado en diversas ocasiones que las sustancias aisladas de especies vegetales presentan una menor eficacia que las preparaciones tradicionales o sus diversos extractos. Es factible que las interacciones farmacológicas o sinergismo entre dos o más sustancias presentes en tales extractos, sean esenciales para el óptimo desempeño de la actividad biológica. Por ello, además de la necesidad de nuevos agentes terapéuticos, surge la necesidad del desarrollo de formulaciones en las que se conserve la eficacia farmacológica de los extractos.



#### IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿ Los extractos y fracciones obtenidas de *Cecropia obtusifolia* ejercen un efecto hipoglucémico en ratones ?

¿ A partir de *Cecropia obtusifolia* es posible desarrollar un fitofármaco útil para el control de la diabetes mellitus tipo 2?

#### V. HIPÓTESIS

Si *Cecropia obtusifolia* ejerce actividad hipoglucemiante en modelos experimentales animales, entonces es posible desarrollar un fitofármaco de utilidad clínica para el tratamiento de la DM2.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 GENERAL

Evaluar experimentalmente la actividad hipoglucemiante de *Cecropia obtusifolia* y establecer las bases fitoquímicas y terapéuticas para la producción de un fitofármaco antidiabético.

### 6.2 PARTICULARES

- a) Evaluar la actividad hipoglucemiante de los extractos metanólico y acuoso de *C. obtusifolia* con base en un fraccionamiento biodirigido.
- b) Determinar los posibles efectos tóxicos del extracto metanólico de *C. obtusifolia* en un modelo agudo.
- c) Caracterizar fitoquímicamente las fracciones con mayor actividad hipoglucemiante de los extractos metanólico y acuoso de *C. obtusifolia*.
- d) Elaborar un fitofármaco hipoglucemiante estandarizado a partir de *C. obtusifolia*.
- e) Evaluar clínicamente la eficacia y seguridad terapéutica del fitomedicamento de *C. obtusifolia* en pacientes diabéticos.

## VII. METODOLOGÍA

### 7.1 MATERIAL VEGETAL

Las hojas de *Cecropia obtusifolia* fueron colectadas en Ixhuatlán, en el estado de Veracruz. *Marrubium vulgare*, a su vez, en Coajomulco, Morelos; ambos en el mes de agosto del año 1999. Se prepararon ejemplares de herbario para su determinación botánica por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, directora del Herbario del Instituto Mexicano del Seguro social (IMSSM), en donde se depositaron 3 ejemplares para su resguardo bajo números de registro progresivo del 13599 al 13601.

El material vegetal fue secado en las instalaciones del CIBIS sobre camas construidas con alambre galvanizado, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Una vez seco, fue finamente molido con un equipo eléctrico (Pulvex) hasta obtener partículas de un tamaño inferior a 3 mm.

- a) Preparación del extracto metanólico. Las hojas secas (1.2 kg) fueron extraídas durante 48 horas a temperatura ambiente por maceración en n-hexano (Hex) por dos ocasiones; el material vegetal remanente fue secado para ser extraído nuevamente por percolación en n-metanol (Me-OH) 3 veces. El material disuelto fue separado del disolvente a presión reducida, mediante un rotaevaporador (Buchi R-124).
- b) Preparación del extracto acuoso. Las hojas secas (7.3 kg) fueron extraídas en agua destilada a 97 °C, con una relación de 1g de material vegetal por 10 ml de agua (Lozoya-Meckes y Mellado-Campos, 1985); manteniéndose en un

contenedor cerrado durante 30 minutos. El material disuelto fue secado por liofilización.

El rendimiento de los extractos se calculó registrando el peso de 5 alícuotas de 1 ml c/u, evaporadas a sequedad en una parrilla de calentamiento.

## **7.2 PRUEBAS FARMACOLÓGICAS**

Los protocolos experimentales se apegaron a las normas mexicanas vigentes para el manejo de animales, (NOM-062-ZOO-1999). En el caso del fraccionamiento biodirigido y la evaluación de toxicidad, se utilizaron ratones macho adultos, de la cepa Balb-C, con un peso de 23-26 g o ratones hembra de 21-23 g respectivamente. Para la evaluación del efecto hipoglucémico del AC, se emplearon ratas macho Wistar de 350 g de peso.

Los animales fueron mantenidos en el bioterio del CIBIS, bajo condiciones controladas de iluminación (12 horas de oscuridad), a  $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$  de temperatura, dieta especial para roedores (2018S Harlan Teklad) y agua a libre demanda. La glucemia fue determinada a partir de sangre total, utilizando un equipo Accutrend Sensor (Roche). El alimento fue retirado 4 horas antes de cada experimento.

Los extractos y fracciones fueron redisueltos en solución salina fisiológica (SSF) y aplicados i.p. en un volumen de 0.8 ml/100 g de peso, en diferentes dosis, los grupos control recibieron únicamente SSF.



### 7.2.1 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO

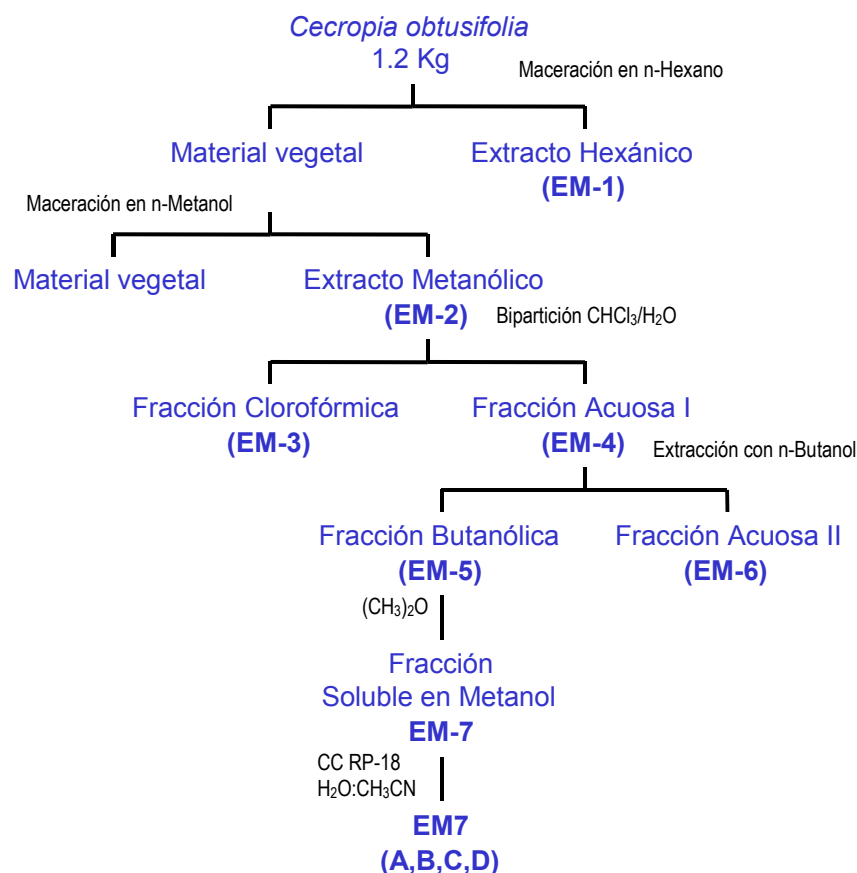
El procedimiento para la separación de los compuestos presentes en los extractos metanólico y acuoso, fue diseñado con base en los resultados de la actividad hipoglucemiante. La evaluación biológica se realizó en ratones macho sanos, para lo cual se formaron grupos de 8 individuos. Se cuantificó la glucemia durante un curso temporal, a las 0, 2 y 4 horas posteriores a la administración de diferentes dosis de los extractos o fracciones, (0.25-2.0 g/kg de peso). Los grupos utilizados como control positivo recibieron insulina (0.5 U/kg, s.c.). A continuación se detallan los criterios y procedimientos empleados.

#### A) EXTRACTO METANÓLICO

En la Fig. No. 9 se resume el procedimiento correspondiente a la separación biodirigida del extracto metanólico de *C. obtusifolia*.

De acuerdo con reportes en los que se establece la presencia de saponinas en la especie (Gupta, 1995) y del conocimiento que compuestos de este tipo poseen actividad hipoglucemiante (Ivorra et al., 1989; Ling-Hua y Pei-Gen, 1993; Pérez et al., 1998), se decidió separar los componentes del extracto por el método común para la obtención de saponinas. Una porción del extracto metanólico (EM-2), con un peso de 60 g, se disolvió en agua (H<sub>2</sub>O) y se extrajo con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) por 3 ocasiones. Los extractos clorofórmicos fueron concentrados a presión reducida hasta obtenerse 38 g de una fracción soluble en CHCl<sub>3</sub> (EM-3). La fracción soluble en H<sub>2</sub>O (EM-4) se extrajo a su vez con Bu-OH 3 veces. Los extractos orgánicos se reunieron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido (13.8 g) se redisolvió en 50 ml

de H<sub>2</sub>O y se adicionaron 50 ml de éter etílico -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O- hasta obtener un precipitado amorfo, el cual se filtró y lavó con el mismo disolvente.



**Figura No. 9** Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de *C. obtusifolia*

El precipitado seco (2.8 g), se aplicó entonces en un cartucho de cromatografía (Waters sep-pack vac), empacado con sílica enlazada de fase reversa (RP-18). La elusión se inició con H<sub>2</sub>O, incrementando la fuerza elutrópica con acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), se obtuvieron 8 fracciones de 10 ml c/u, las cuales fueron reunidas en 4 fracciones, de acuerdo a su homogeneidad en cromatografía en capa fina (CCF) de RP18, como se muestra en la Tabla No. 4.

**Tabla No. 4** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EM-7, obtenida del extracto metanólico de *C. obtusifolia*.

Eluyente	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN	9:1	1-2	1-2	EM7-1	1.34
H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN	8:2	3-4	3	EM7-2	0.23
H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN	7:3	5-6	4-7	EM7-3	0.04
H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN	5:5	7	8	EM7-4	0.19
MeOH	100%	8			

Una segunda porción de 60 g del extracto metanólico (EM-2), se suspendió en agua y se extrajo por 3 veces con Hex, durante este proceso se separaron tres fases: la soluble en agua, la soluble en Hex y una tercera (interfase) soluble en diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) con un peso de 38 g. El producto fue aplicado a una columna líquida de vacío empacada con 175 g de sílica gel 60. La elución se inició con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hex 1:1 incrementándose la polaridad con acetona, se obtuvieron 76 fracciones de 125 ml cada una, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud en CCF, como se muestra en la tabla No. 5.

La fracción VIII (4.1 g) fue purificada mediante cromatografía en columna empacada con 140 g de sílica gel y utilizando un gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ Acetona como eluyente, se colectaron 73 fracciones de 75 ml cada una, las cuales fueron agrupadas de acuerdo a su similitud en CCF como se muestra en la tabla No. 6.

La fracción 5 mostró en CCF la presencia de un solo compuesto, el cual fue caracterizado como  $\beta$  sitosterol (Fig. No. 19, 2) por comparación directa con una muestra auténtica disponible en el laboratorio.

**Tabla No. 5** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EM-7, obtenida del extracto metanólico de *C. obtusifolia*.

Eluyente	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Hex			
1 :1	1-8	1-3	I
6 :4	9-14	4-6	II
7 :3	15-19	7-23	III
8 :2	20-24	24-39	IV
9 :1	25-29	40-43	V
10 :0	30-36	44-47	VI
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Acetona			
9 :1	37-42	48-55	VII
8 :2	43-47	56-76	VIII
7 :3	48-53		
6 :4	54-59		
5 :5	60-66		
4 :6	67-73		
3 :7	74-76		

**Tabla No. 6** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción VIII

Eluyente	Proporción	Fracciones obtenidas	Compuestos aislados
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> / Acetona			
8:2	1-13	1-4	
7:3	14-23	5	β sitosterol
6:4	24-33	6-8	
1:1	34-43	9-15	Acidos ursólico y oleanólico
4:6	44-53	16-19	
3:7	54-63	20-23	
2:8	64-70	24-26	
0:10	71-73	27-38	Glucósido de β sitosterol
		39-43	
		44-46	
		47-55	
		56-57	
		58	
		59-62	
		63-75	

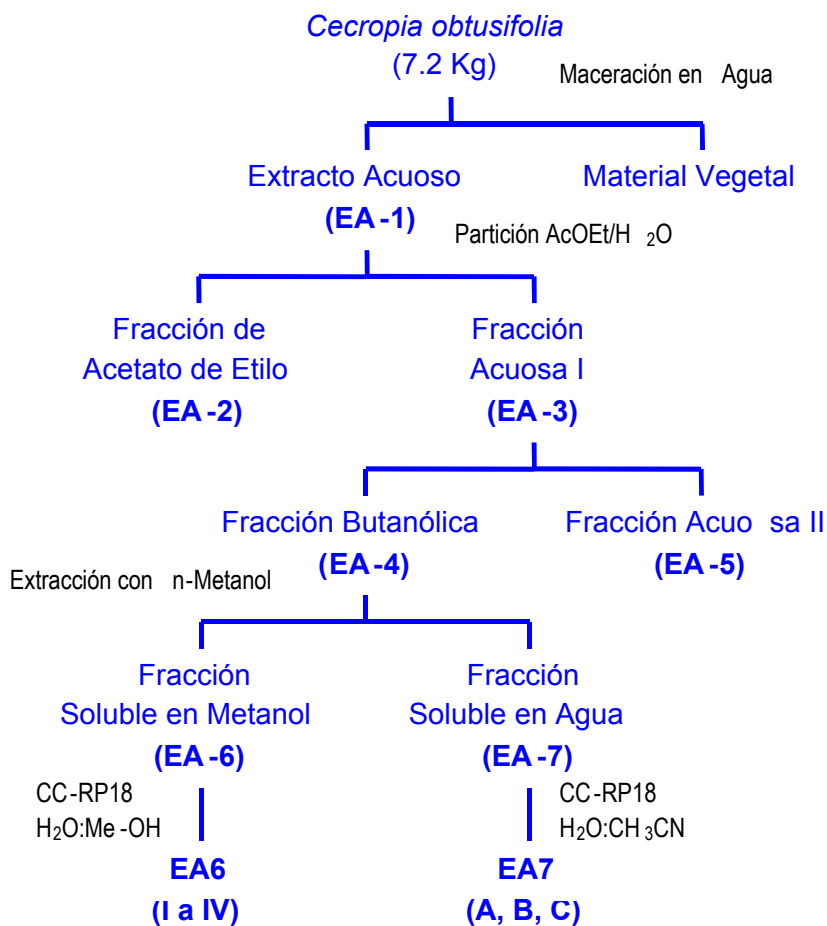
Posteriormente, la reunión 9-15 precipitó espontáneamente por lo que se filtró y lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , obteniéndose un sólido blanco amorfo identificado como la mezcla de los ácidos ursólico (Fig. No 19, 4) y oleanólico (Fig. No. 19, 5) por comparación directa (CCF y punto de fusión mixto) con una muestra auténtica obtenida de *Astianthus viminalis* (Meckes et al., 2001).

La reunión 27-38 mostró un precipitado blanco amorfo el cual se filtró y lavó con Hex y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , el producto obtenido fue un sólido blanco de pf 180-195°C identificado como el glucósido de  $\beta$ -sitosterol (Fig. No. 19, 2) por medio del análisis de sus datos espectroscópicos y comparación directa con muestra auténtica.

Las aguas madres de la fracción 27-38 (300 mg) se aplicaron a una columna de vidrio empacada con 9 g de alúmina; se obtuvieron 3 fracciones, la primera denominada 43A (127 mg) eluída con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  al 100%, la segunda 43B (67.6 mg) y la tercera 43C (91.7 mg). La fracción 43B fue acetilada con 2 ml de una mezcla 2:1 de anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ )/piridina a temperatura ambiente. La mezcla se dejó reaccionar durante toda la noche, se agregaron 5 g de hielo para detener la reacción y el producto se extrajo con 30 ml de acetato de etilo (AcOEt), por 3 ocasiones. La fase orgánica fue purificada mediante CCF preparativa de sílica gel, utilizando un sistema de Hex-AcOEt 7:3 como eluyente. De esta cromatografía se obtuvieron 37 mg de un producto sólido amorfo con  $R_f = 0.5$ , el cual fue caracterizado como el ácido bassico (Fig. No. 19, 6) por medio de análisis e interpretación de sus datos espectroscópicos de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (datos no mostrados).

## B) EXTRACTO ACUOSO

El fraccionamiento biodirigido llevado a cabo con el extracto acuoso se resume en la Fig. No. 10.



**Figura No. 10** Fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso de *C. obtusifolia*

El extracto acuoso liofilizado (EA-1), con peso de 622 g fue resuspendido en H<sub>2</sub>O y extraído con AcOEt por 3 ocasiones. Los extractos orgánicos fueron reunidos y concentrados a presión reducida para obtener una fracción soluble en AcOEt (EA-2). La fracción acuosa remanente (EA-3) fue posteriormente extraída con BuOH 3 veces, rindiendo una fracción soluble en BuOH (EA-4) y una fracción soluble en H<sub>2</sub>O

(EA-5). La fracción EA-4 fue concentrada a presión reducida y el residuo fue extraído con Me-OH por 3 ocasiones, para dar una fracción soluble en Me-OH (EA-7) con peso de 60.2 g..

A continuación, 15 g de EA-6 se adsorbieron en igual cantidad de sílica RP-18 y se aplicó a una columna líquida de vacío (CLV), empacada con 150 g de sílica de fase enlazada RP-18. La elusión se inició con H<sub>2</sub>O al 100%, se incrementó la fuerza elutropica con Me-OH, se colectaron 37 fracciones de 100 ml c/u, las cuales fueron reunidas en 4 fracciones, de acuerdo a su homogeneidad en CCF, como se muestra en la Tabla No. 7.

**Tabla No. 7** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EA-6, obtenida del extracto acuoso de *C. obtusifolia*.

Eluyente	Proporción	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Clave
H <sub>2</sub> O	100%	1-8	1	EA-6A
H <sub>2</sub> O/MeOH	95:5	9-24	2-5	EA-6B
H <sub>2</sub> O/MeOH	5:5	25-28	6-17	EA-6C
MeOH	100%	29-37	30-31	EA-6D

Una parte alícuota de 850 mg de EA-7 se aplicó a un cartucho de extracción en fase sólida de 10 g de sílica RP-18, eluyendo con un sistema isocrático de H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (3:2), se colectaron fracciones de 100 ml c/u, las cuales se reunieron en 3 fracciones denominadas EA-7, A, B y C, de acuerdo a su homogeneidad en CCF.

La fracción EA-7B fue acetilada con 2 ml de una mezcla 2:1 de Ac<sub>2</sub>O-piridina a temperatura ambiente. La reacción fue seguida por CCF y fue detenida mediante la adición de 3 g de hielo, después de 12 horas. El producto de reacción fue extraído con AcOEt y el residuo (1g) fue separado en sus componentes mediante

cromatografía en una columna empacada con 30 g de sílica gel, eluyendo con un gradiente de polaridad creciente de Hex-AcOEt-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH. Se colectaron 68 fracciones de 20 ml c/u, como se detalla en la tabla No. 8.

Las fracciones fueron reunidas con base en su similitud en CCF. El análisis de las fracciones 40-45 por GC-MS indicó la presencia de la mezcla de myoinositol, glucosa y ácido arabinónico.

El análisis de la reunión de las fracciones 46-52 (157 mg) indicó la presencia del ácido 9-hexadecenóico (Fig. No. 19, 10).

**Tabla No. 8** Fraccionamiento cromatográfico de la fracción EA-7B, obtenida del extracto acuoso de *C. obtusifolia*.

Eluyente n-Hex:AcOEt:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Fracciones obtenidas	Fracciones reunidas	Peso (mg)	Observaciones
100:0:0:0	1-4	40-45		Myoinositol Glucosa, Ácido arabinónico
98:2:0:0	5-11	46-62	157 mg	Ácido hexadecenóico
95:5:0:0	12-17	53-58	147 mg	Arabinosa
90:10:0:0	18-23			
85:15:0:0	24-28			
80:20:0:0	29-35			
75:25:0:0	36-40			
70:30:0:0	41-46			
0:0:100:0	47-52			
0:0:95:5	53-58			
0:0:80:20	59-64			
0:0:50:50	65-68			

La fracción 53-58 (147 mg) contenía una mezcla de compuestos, por lo que se aplicó a una columna empacada con 5 g de sílica gel eluyendo con un gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. El análisis de GC-MS de las fracciones 1-6 permitió la identificación del ácido 9-hexadecenóico (Fig. No. 19, 10) y del glucósido del ácido absísico (Fig. No. 19, 12). Las fracciones 31-32 mostraron en CCF una sola mancha por lo que se



reunieron, el producto fue identificado como la friedelina (Fig. No. 19, 11) por su análisis en CG-MS.

### **7.2.2 TOXICIDAD AGUDA**

La dosis experimental se estableció con base en el método por etapas descrito en el protocolo No. 423 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD).

Se administraron 3 g/kg del extracto metanólico a 4 ratones hembra y 4 machos en un esquema por etapas. Se aplicó el extracto al primer animal y se le observó por intervalos de 2 horas, durante 24 horas, antes de continuar con el siguiente individuo. En todos los casos los animales fueron observados durante los 14 días posteriores a la administración, evaluándose diversos signos (Tabla No. 9). El día 15, los animales fueron sacrificados, anestesiándolos con éter etílico; sus órganos (hígado y riñón) fueron extraídos, lavados en SSF y fijados en formaldehído al 10% para su análisis histológico. Se incluyeron posteriormente en parafina y se elaboraron cortes de 8µm los cuales fueron teñidos por la técnica de hematoxilina-eosina para su análisis por microscopía óptica.

**Tabla No. 9** Parámetros biológicos evaluados en la prueba toxicológica

<b>PARÁMETRO EVALUADO</b> <b>(0): sin cambio, (+): aumento,</b> <b>(-): disminución</b>
1) Actividad exploratoria
2) Actividad prensil (extremidades anteriores y posteriores)
3) Ataxia
4) Defecación-Micción
5) Deshidratación
6) Equilibrio
7) Palidez
8) Piloerección
9) Reacción de alarma
10) Reflejo de enderezamiento

### 7.3 ESTUDIO CLÍNICO

Se realizó un ensayo clínico experimental, aleatorizado, doble ciego y controlado, con pacientes de la U.M.F. No. 1 de la ciudad de Cuernavaca, Morelos para explorar la efectividad y tolerabilidad del fitofármaco elaborado con *Cecropia obtusifolia*. Se empleó como tratamiento placebo *Marrubium vulgare*.

#### **A) Criterios de inclusión:**

- Varones o mujeres con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, con una evolución no mayor a cinco años.
- Cursar con un pobre control metabólico (glucemia en ayuno  $\geq$  a 140 mg/dl) a pesar del uso de glibenclamida.
- No recibir insulina o sus análogos.
- Edad de 30 a 60 años.

- Sin manifestaciones aparentes de complicaciones crónicas o agudas relacionadas con la DM2.

**B) Criterios de exclusión:**

- Embarazo.
- Presentar DM1.
- Pacientes hospitalizados.
- Necesidad de viajar constantemente.

**C) Criterios de eliminación:**

- El deseo voluntario de abandonar el tratamiento experimental
- No apego al tratamiento
- Desarrollo de efectos adversos o procesos patológicos que afectaran el resultado del estudio (infecciones, cirugías, accidentes, etc.).

Se reclutaron 43 pacientes quienes firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo I), de acuerdo con la declaración de Helsinki (The World Medical Association), aceptando participar en el ensayo.

Además del tratamiento con glibenclamida, 22 pacientes recibieron el tratamiento correspondiente a *C. obtusifolia* y 21 el de *M. vulgare*, según una tabla de números aleatorios, así como instrucciones verbales y escritas sobre su forma de elaboración y administración. Tres veces al día antes de cada alimento, durante 21 días, cada paciente preparó una infusión colocando durante 5 minutos un sobre, con el

fitofármaco o placebo, en 250 ml de agua a punto de ebullición. El líquido fue bebido tibio sin adicionarle ningún otro elemento.

Cada semana se valoró clínicamente a los pacientes, para determinar posibles efectos adversos y la adherencia al tratamiento. En todos los participantes se determinó en ayuno, al inicio y final del tratamiento, la concentración plasmática de glucosa, colesterol y triglicéridos totales, urea, creatinina y ácido úrico. Tales determinaciones se realizaron siguiendo las técnicas estándares (Tabla No. 10) con un equipo automático (Autolab), en colaboración con un laboratorio externo certificado.

Los métodos en general se basan en reacciones enzimáticas cuantificadas indirectamente por una reacción de oxido-reducción en la que se utilizan fenol y 4-aminofenazona los cuales al reaccionar con peróxido de hidrógeno producen un compuesto colorido, directamente proporcional a la concentración del metabolito a cuantificar.

**Tabla No. 10** Métodos estándar para la cuantificación de metabolitos en plasma (Burtis y Ashwood, eds, 1999).

<b>Sustancia</b>	<b>Método de cuantificación</b>
Triglicéridos	Glicerol oxidasa
Colesterol	Colesterol oxidasa
Glucosa	Glucosa oxidasa
Urea	Glutamina sintetasa
Ácido úrico	Uricasa
Creatinina	Creatinasa

### 7.3.1 FORMULACIÓN DEL FITOFÁRMACO

Se utilizaron las hojas secas y trituradas de *C. obtusifolia*, preparadas como se indicó en la sección 6.1. Dosis de 1 g de material, estandarizado en AC ( $2.99 \pm 0.14$  mg/g de material vegetal), fueron empacadas en sobres de papel filtro. Se utilizaron las hojas molidas de *Marrubium vulgare* para preparar una formulación equivalente. Los productos fueron identificados como tratamiento “A” y “B”, cuyos códigos fueron revelados al finalizar el análisis de resultados.

### 7.3.2 ESTANDARIZACIÓN DEL FITOFÁRMACO

El contenido de AC se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), por el método de estándar interno. Se utilizó un equipo analítico Merck Hitachi D-6000 con automuestreador A5-2000A y detector de arreglo de diodos modelo L-4500.

Se extrajeron, tres ocasiones consecutivas, 200 mg del material vegetal con 10 ml de Hex. Posteriormente se extrajo la misma muestra con 10 ml de Me-OH, en 3 turnos. El disolvente recuperado se llevó a completa sequedad y se prepararon alícuotas de 10 mg/ml en Me-OH (grado HPLC), de acuerdo a lo establecido por Ortiz (2003). Las muestras fueron analizadas en una columna Chromolite performance RP-18e (100 x 4.6 mm, Merck). Se eluyó con un flujo de 1.4 ml/min de un sistema isocrático de  $H_3PO_4(0.04M):CH_3CN:MeOH: 90:5:5$ . La detección del producto se realizó a 255 nm, a 25 °C a un  $R_t = 5.9$  min.

Se construyó una curva de calibración inyectando 50  $\mu\text{l}$  de diferentes concentraciones de AC (20, 40, 80, 120  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) con base en un compuesto puro (C-3878, Sigma) como estándar.

#### **7.4 PRUEBAS ESTADÍSTICAS**

En el caso de la evaluación toxicológica y las pruebas biológicas la determinación de diferencias entre grupos se estableció por un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Bonferroni. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron como significativos.

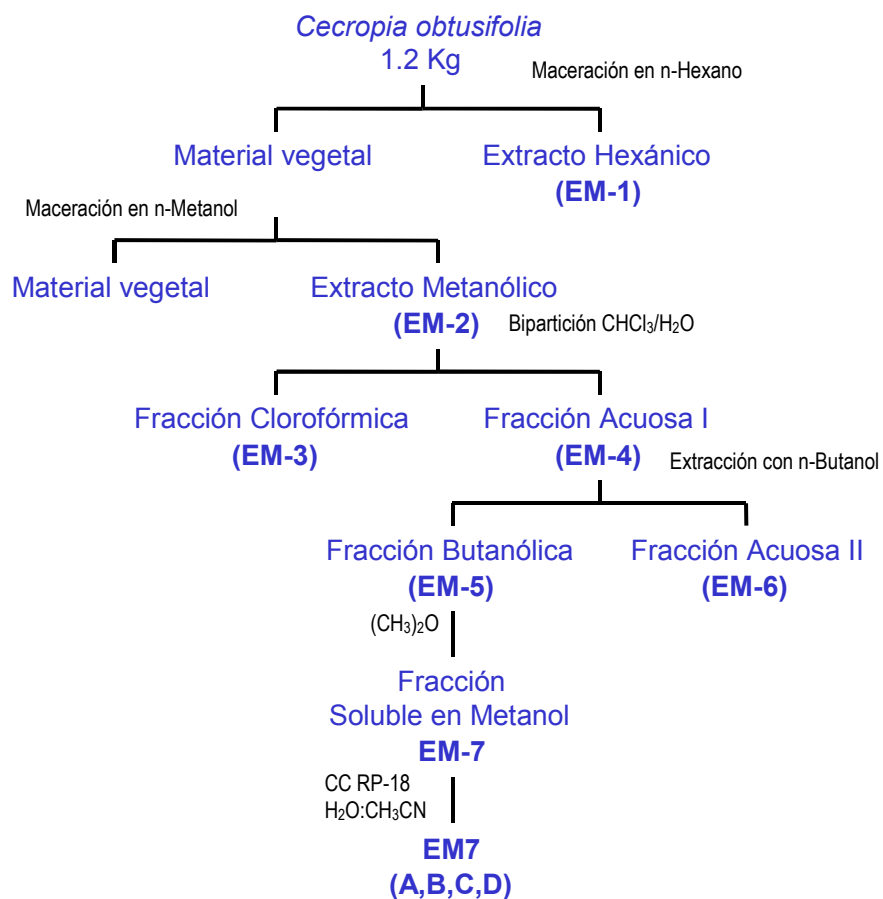
En el caso del ensayo clínico, las diferencias intragrupal de las variables continuas con distribución normal se establecieron por una prueba de ANOVA para muestras pareadas y por la prueba de Wilcoxon en caso contrario.

Para definir las diferencias intergrupales se utilizó la prueba de ANOVA para muestras independientes en el caso de variables continuas con distribución normal y la prueba de Mann-Whitney en caso de distribución no normal. Prueba de  $\text{Chi}^2$  para detectar diferencias con variables categóricas. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 EXTRACTO METANÓLICO

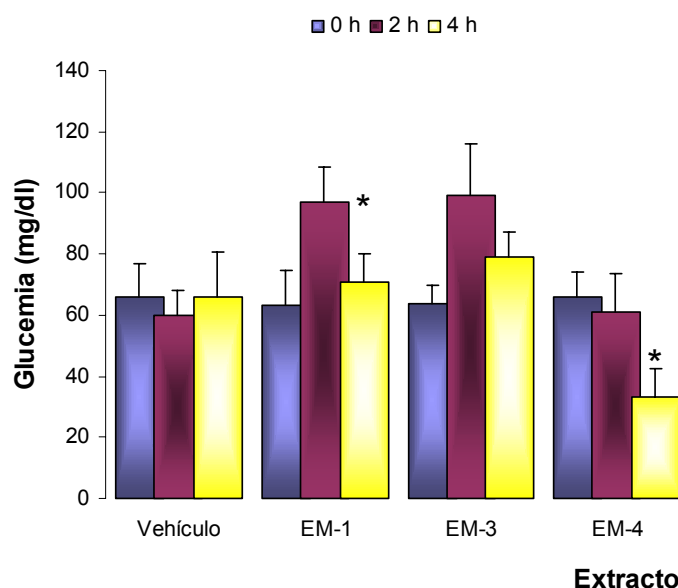
Como se describió en la sección 7.2.1.A, el fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico se realizó como lo muestra la Fig. No. 9.



**Figura No. 9** Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de *C. obtusifolia*.

El extracto metanólico (EM-2) presentó un rendimiento de 10.5% a partir de planta seca. Administrado i.p. en animales sanos disminuyó la glucemia en ayuno, con

respecto al grupo control, en un 20% ( $p < 0.02$ ). El extracto fue separado consecutivamente por particiones líquido/líquido con Hex,  $\text{CHCl}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . El extracto soluble en hexano (EM-1) y la fracción soluble en  $\text{CHCl}_3$  (EM-3) indujeron hiperglucemia a las 2 h de iniciado el tratamiento, mientras que la fracción acuosa I (EM-4) disminuyó un 50% la glucemia ( $p < 0.05$ ) a las 4 horas de administrado el producto (Fig. No. 11).

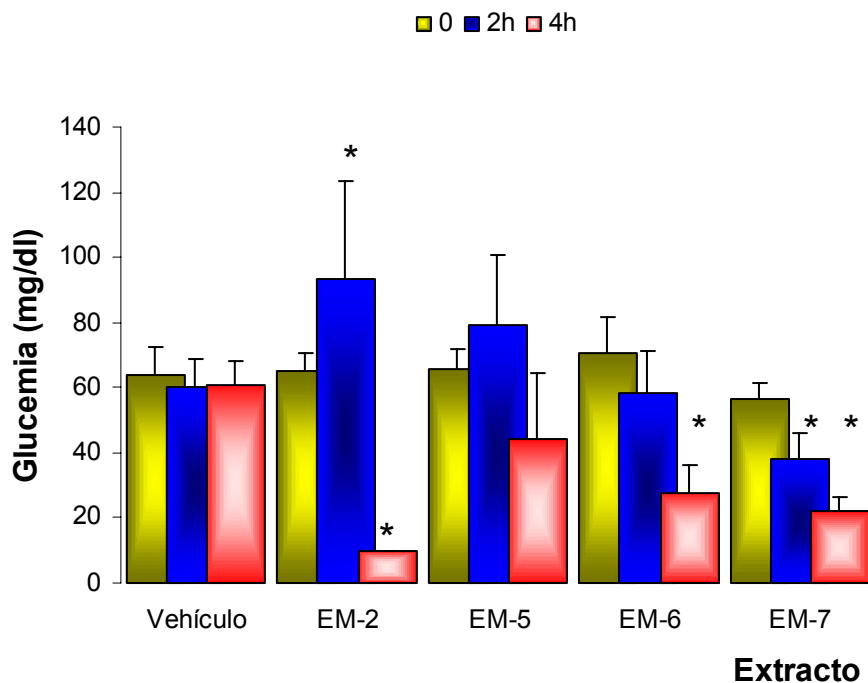


**Figura No. 11** Glucemia posterior a la administración i.p., de 2g/kg del extracto hexánico (EM-1) o las fracciones clorofórmica (EM-2) y acuosa I (EM-4) de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E.  $n=6$ . \*=  $p < 0.05$  prueba de *t*.

Posteriormente, y a partir de EM-4, se obtuvieron tres nuevas fracciones de interés: butanólica (EM-5), acuosa II (EM-6) y soluble en metanol (EM-7). Observamos una vez más el efecto hiperglucemiante ( $p < 0.05$ ) producido por la administración de EM-2; la modificación más importante se obtuvo a las 4 horas de iniciado el tratamiento, con disminuciones del 84% para EM-2, 33% en el caso de EM-5, 60% para EM-6, y



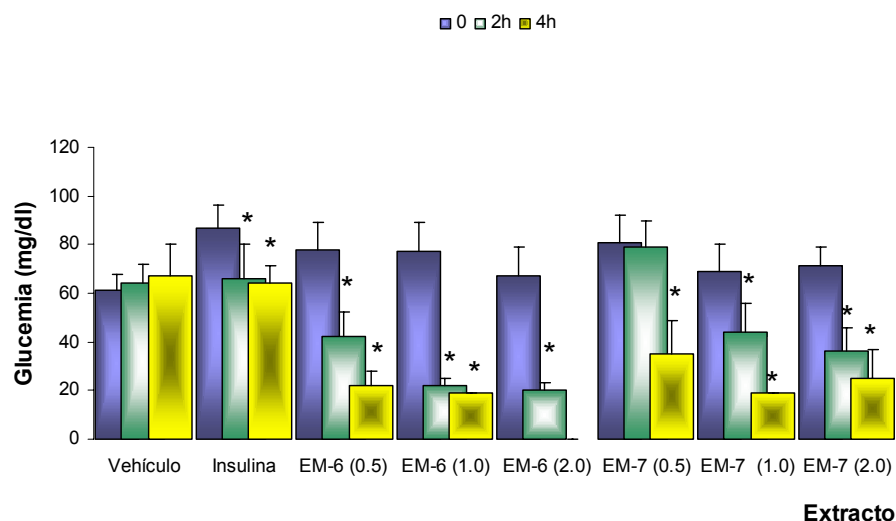
61% después de la administración de EM-7, este último disminuyó un 33% la glucemia a las 2 h (Fig. No. 12).



**Figura No. 12** Glucemia posterior a la administración i.p. de 2 g/kg del extracto metanólico (EM-2) o las fracciones butanólica (EM-5), acuosa II (EM-6) y soluble en metanol (EM-7) de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E. n=6. \*= p < 0.05 prueba de t.

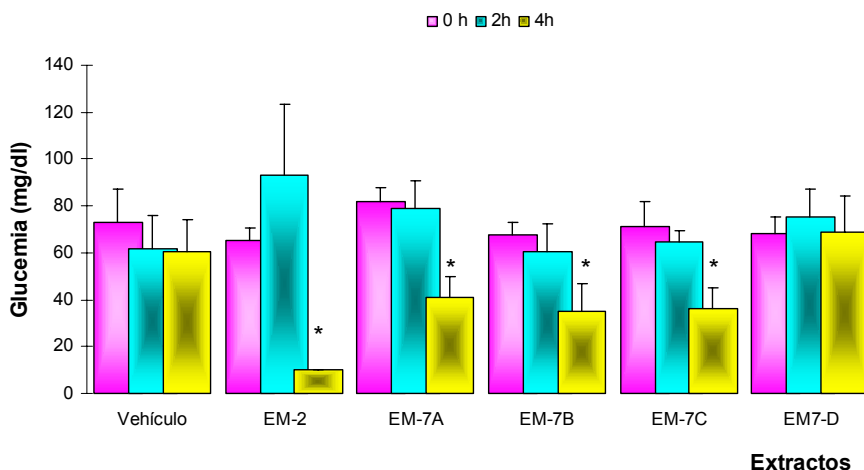
Con el objeto de determinar un efecto dosis dependiente, se administraron i.p. 0.5, 1.0 y 2.0 g/kg de peso, de las fracciones más activas (EM 6 y 7). Se observó una tendencia a la disminución de la glucemia en ambas fracciones; con una disminución progresiva en la concentración de glucosa a las 2 y 4 horas; EM-6 disminuyó la glucemia 46, 71 y 70%, con las dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg, respectivamente. La actividad hipoglucemiante producida por la dosis de 2 g/kg provocó hipotermia, letargo y palidez en los animales, por lo que a este grupo se le aplicó p.o. solución glucosada al 50%, para evitar su muerte. EM-7 a la dosis de 0.5 g/kg sólo indujo

hipoglucemia a las 4 horas con una disminución del 57%; el efecto más importante se observó con la dosis de 1 g/kg al reducir la concentración plasmática de glucosa un 72%, a las 4 horas después de su administración; la dosis de 2 g/kg disminuyó la glucemia en 49 y 65 % a las 2 y 4 h, respectivamente (Fig. No. 13).



**Figura No. 13** Glucemia posterior a la administración i.p. de 1g/kg de las fracciones acuosa II (EM-6) y soluble en metanol (EM-7) de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E. n=8. \*= p < 0.05 prueba de t.

EM-7 fue separado en sus componentes mediante CC RP-18, obteniéndose cuatro fracciones (A, B, C, D), de las cuales la menos polar (EM-7D) fue la única que no mostró actividad hipoglucemiante. Una vez más, la fracción de mayor polaridad, EM-7A, promovió una actividad hipoglucemiante del 50% a las 4 horas; la disminuciones al mismo intervalo para EM-7 B y C fueron del 49% (Fig. No. 14).



**Figura No. 14** Glucemia posterior a la administración de 0.5 g/kg del extracto metanólico (EM-2) o las fracciones EM7 A, B, C y D de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E. n=6. \*= p < 0.05 prueba de *t*.

## 8.2 EXTRACTO ACUOSO

El rendimiento del extracto acuoso fue del 8.5%. De acuerdo a la sección 7.2.1.B (Fig. No. 10), la evaluación biológica se inició administrando a los grupos experimentales i.p., 0.5 g/kg de peso de los extractos; acuoso íntegro (EA-1), o las fracciones de acetato de etilo (EA-2), acuosa II (EA-5) o soluble en metanol (EA-6). La fracción de menor polaridad, EA-2, no produjo efecto hipoglucémico; en contraste, EA-1, 5 y 6 disminuyeron la concentración plasmática de glucosa con valores de 31, 41 y 17% respectivamente (Fig. No. 15).

Con base en la disminución en la glucemia observadas en las fracciones EA-5 y 6, se probó su efecto a dosis de 0.25 y 0.5 g/kg de peso, para establecer tendencias en la actividad biológica, EA-1 y 5 (ambos solubles en agua) provocan hiperglucemia en ambas dosis, a las 2 h, EA-6 disminuye un 19% la glucemia únicamente a la dosis de 0.25 g/kg de peso, sin efecto hiperglucémico (Fig. No. 16).

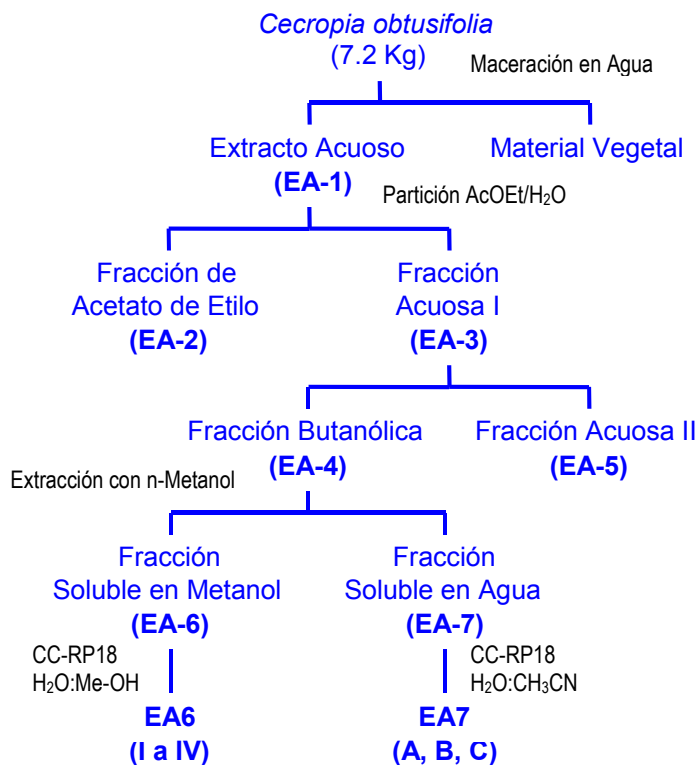


Figura No. 10 Separación biodirigida del extracto acuoso de *C. obtusifolia*.

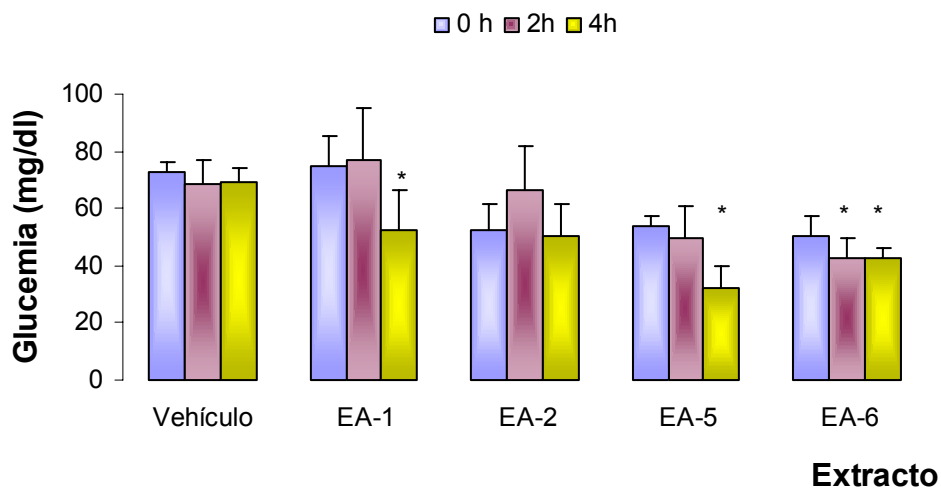
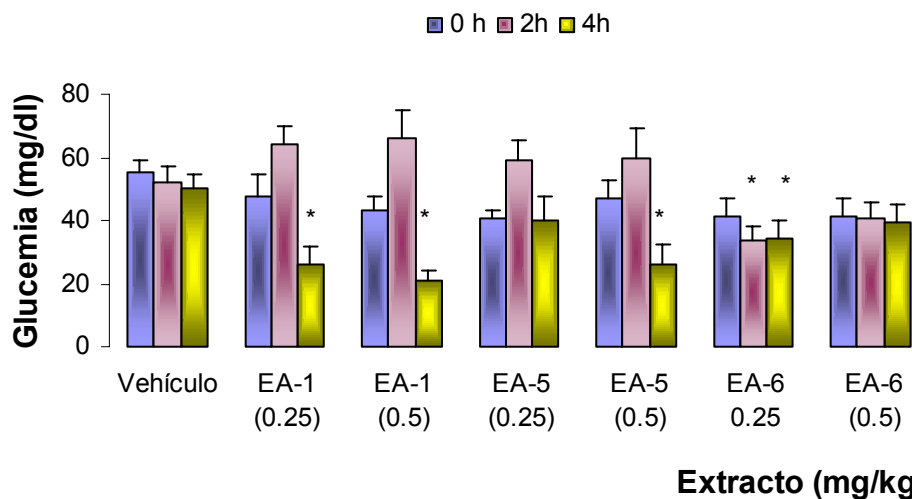


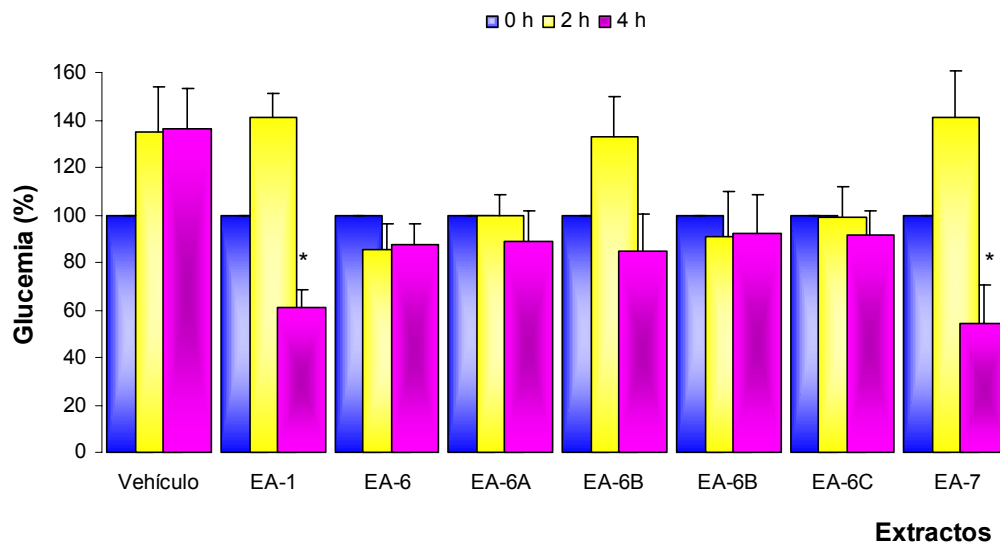
Figura No. 15 Glucemia posterior a la administración de 0.5 g/kg del extracto acuoso (EA-1) o las fracciones, de acetato de etilo (EA-2), acuosa II (EA-5) y soluble en metanol (EA-6) de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E. n=6. \* =  $p < 0.05$  prueba de *t*.



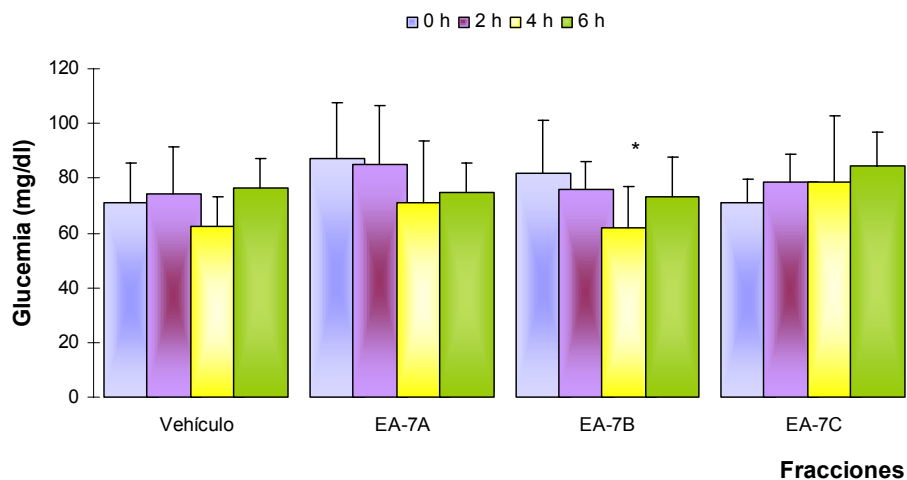
**Figura No. 16** Glucemia posterior a la administración de diferentes dosis del extracto acuoso (EA-1) o las fracciones acuosa II (EA-5) y soluble en metanol (EA-6) de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E.  $n=6$ .  $*= p < 0.05$ , prueba de *t*.

EA-6 fue separada por medio de una CC RP-18, las fracciones obtenidas fueron etiquetadas como EA-6 A, B, C y D, las cuales fueron valoradas en diferentes grupos de animales sanos, sin que se observara el efecto biológico cuantificado (Fig. No. 17).

A partir de la fracción soluble en agua (EA-7), por CC RP-18 se obtuvieron las fracciones denominadas EA-7 A, B y C, las cuales fueron igualmente probadas, únicamente EA-7B disminuyó en 24% la glucemia (Fig. No. 18).



**Figura No. 17** Glucemia posterior a la administración de 0.5 g/kg del extracto acuoso (EA-1) o 0.3 g/kg de la fracción soluble en metanol (EA-6) y EA-6 A, B, C y D de *C. obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E. n=8. \*= p < 0.05, prueba de t.



**Figura No. 18** Glucemia posterior a la administración de 0.4 g/kg de las fracciones EA-7, A, B y C de *Cecropia obtusifolia* en ratones sanos. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.E. n=8. \*=p < 0.05 prueba de t.

### 8.3 AISLAMIENTO DE COMPUESTOS

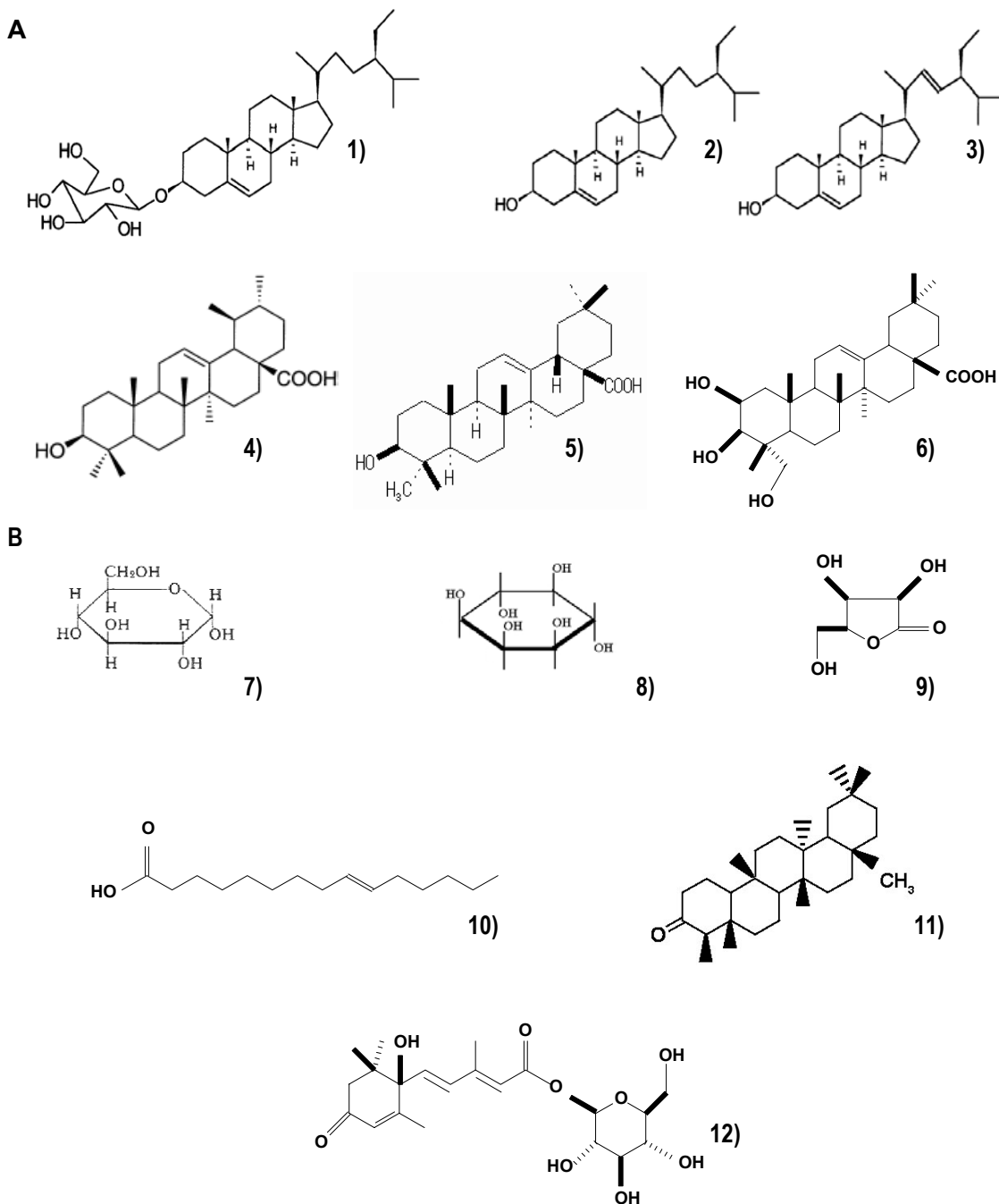
A partir del extracto metanólico se aisló una mezcla de azúcares, identificados por su análisis en CG-MS como myoinositol (8), glucosa (7), y ácido arabinónico (9), ácido 9-hexadecenónico (10), glucósido del ácido absísico (12) y friedelina (11) (Fig. No. 19).

La separación cromatográfica del extracto acuoso permitió el aislamiento y caracterización del glucósido de  $\beta$  sitosterol (1) y su aglicona (2), estigmasterol (3) y los ácidos ursólico (4) oleanólico (5) y bassico (6) (Fig. No. 19).

Con excepción del ácido bassico (6), todos los compuestos fueron caracterizados por comparación directa por CCF y punto de fusión mixto, con muestras auténticas disponibles en el laboratorio. El ácido bassico fue determinado por medio del análisis e interpretación de sus constantes físicas y datos espectroscópicos (datos no mostrados).

### 8.4 TOXICIDAD AGUDA

Los resultados de la prueba aguda de toxicidad indicaron que para el extracto metanólico de *C. obtusifolia* a una dosis de 3 g/kg de peso corporal v.o., no existe mortalidad ni modificación de los parámetros evaluados, por lo que presenta toxicidad clase 4, es decir, prácticamente inocua de acuerdo a los criterios de la OECD. El análisis histológico indicó una morfología homogénea y normal en todos los órganos estudiados.



**Figura No 19** Compuestos aislados a partir de *C. obtusifolia*. **A** Extracto acuoso 1) Glucósido de  $\beta$  sitosterol 2)  $\beta$  sitosterol 3) estigmasterol, ácidos 4) ursólico, 5) oleanólico y 6) bassico. **B** Extracto metanólico 7) glucosa, 8) myoinositol, 9) ácidos arabinónico y 10) hexadecenóico, 11) friedelina, 12) glucósido del ácido absísico.



## 8.6 ESTUDIO CLÍNICO

En el estudio clínico se incluyeron en total 43 pacientes diabéticos con pobre control metabólico, de acuerdo al European NIDDM policy group, el ensayo fue controlado y cegado tanto para los pacientes como para los médicos. Las características generales de los participantes se observan en la Tabla No. 11.

**Tabla No. 11** Características generales de los pacientes al inicio del estudio clínico. IMC (índice de masa corporal), TAS (tensión arterial sistólica), TAD (tensión arterial diastólica).

Parámetro	<i>C. obtusifolia</i> (n = 22)			<i>M. vulgare</i> (n = 21)			ANOVA p
	Promedio	ES	95% IC	Promedio	ES	95% IC	
<b>Edad</b>	50.68	1.57	47.39 53.96	50.76	1.74	47.11 54.40	0.97
<b>Peso(kg)</b>	66.81	1.76	63.12 70.49	65.12	2.37	60.15 70.08	0.57
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	28.23	0.78	26.58 29.87	27.01	0.76	25.41 28.60	0.28
<b>Glibenclamida</b> (mg/día)	13.40	0.89	11.53 15.26	13.80	0.96	11.79 15.80	0.77
<b>TAS (mm Hg)</b>	124.54	2.05	120.27 128.80	126.42	2.58	121.03 131.80	0.56
<b>TAD (mm Hg)</b>	77.72	1.76	74.05 81.38	81.66	1.63	78.25 85.06	0.10

Como se muestra en la Tabla No. 12 la administración como coadyuvante, durante 21 días, del fitofármaco elaborado con *C. obtusifolia* disminuyó en un 15% la glucemia basal de las personas que lo ingirieron; del mismo modo, disminuyó la concentración plasmática de colesterol total en 14.6% y la de triglicéridos 42% (ANOVA  $p < 0.02$ ). Asimismo, en el grupo tratado con *M. vulgare* la hiperglucemia en ayuno disminuyó 0.6%, la hipercolesterolemia 4.8% y la hypertriglyceridemia 5.8%. La concentración plasmáticas de urea, creatinina y ácido úrico así como el IMC, peso corporal y tensión arterial no se afectaron durante o al término del tratamiento con el fitofármaco de *C. obtusifolia* o *M. vulgare*.

**Tabla No. 12** Efecto sobre diversos parámetros metabólicos producido por la administración, durante 21 días, del fitomedicamento de *C. obtusifolia* y *M. vulgare* en pacientes con DM2 descontrolada. Los resultados se expresan en mg/dl.

Grupo	Antes del Tratamiento			Después del Tratamiento			Diferencia			ANOVA <i>p</i>
	media	DE	95 % IC	media	DE	95 % IC	media	DE	95 % IC	
<b><i>C. obtusifolia</i></b>										
<b>n= 22</b>										
Glucemia en ayuno	250.94	11.88	226.22 275.65	212.65	13.60	226.22 275.65	38.28	13.20	10.80 65.75	< 0.02
Colesterol	241.27	17.77	204.31 278.22	206.00	11.03	183.04 228.95	35.27	12.10	10.08 60.45	< 0.0001
Triglicéridos	340.50	122.03	86.71 594.28	197.48	25.17	145.11 249.84	143.01	112.25	-90.43 376.45	< 0.02
Urea	25.85	1.43	22.87 28.82	24.84	1.58	21.53 28.14	1.01	1.15	-1.39 3.41	< 0.0002
Creatinina	0.70	0.02	0.63 0.76	0.71	0.02	0.66 0.75	-0.01	0.02	-0.06 0.04	< 0.003
Ácido úrico	3.48	0.32	2.80 4.15	3.65	0.28	3.06 4.23	-0.17	0.16	-0.52..0.18	< 0.0001
<b><i>M. vulgare</i></b>										
<b>n= 21</b>										
Glucemia en ayuno	252.16	13.85	223.25 281.06	250.53	13.15	223.09 277.96	1.62	10.93	-21.11 24.35	< 0.001
Colesterol	204.80	10.92	182.01 227.58	196.23	7.81	179.93 212.52	8.57	7.16	-6.37 23.51	< 0.001
Triglicéridos	151.13	10.68	128.84 173.41	142.39	13.95	113.28 171.49	8.73	9.45	-10.98 28.44	< 0.001
Urea	28.90	1.39	25.98 31.81	29.97	1.64	26.54 33.39	-1.06	1.56	-4.32 2.20	< 0.02
Creatinina	0.79	0.03	0.72 0.85	0.73	0.03	0.65 0.80	0.05	0.03	-0.01 0.11	< 0.004
Ácido úrico	3.06	0.23	2.57 3.54	3.10	0.23	2.61 3.58	-0.03	0.13	-0.31 0.25	< 0.001

## IX. DISCUSIÓN

De acuerdo con los ensayos biológicos utilizados para establecer el efecto hipoglucémico de *C. obtusifolia*, se confirmó que los extractos metanólico y acuoso disminuyen significativamente la glucemia en animales sanos en ayuno.

Los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante de *C. obtusifolia* son de una alta polaridad e inducen un mayor efecto con respecto al extracto íntegro, sin hiperglucemia inicial, en las fracciones solubles en agua EM-6 (72% de disminución después de 4 h) y EA-5 (45% de disminución a las 4 h), ambos administrados en dosis de 0.5 g/kg de peso. Las fracciones purificadas que conservaron la actividad hipoglucemiante corresponden a la separación cromatográfica de las fracciones, soluble en metanol (EM-7) y soluble en agua (EA-7). EM-7 disminuyó en 57% la concentración de glucosa, 4 h después de su administración (0.5 g/kg); por su parte, EA-7 provocó una hipoglucemia del 46%, a las 4 horas de ser administrado a una dosis de 0.3 g/kg. Sin embargo, la separación de estas fracciones indujo una disminución en el rango de 48 a 50% en el caso de EM-7 A, B y C, a las 4 h de su administración y a una dosis de 0.5 g/kg. EA-7 B disminuyó la glucemia, a las 4 horas, sólo 24% al ser administrada a dosis de 0.4 g/kg.

Es importante señalar que el AC puro (Sigma C-3878 y C4,420-6) no disminuyó la hiperglucemia al ser administrado oralmente, en ratas o ratones pretratados con STZ o aloxana, respectivamente, en dosis de 10 ó 20 mg/kg, (datos no mostrados) de acuerdo a lo reportado por Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001). El hecho refuerza la hipótesis de que a menor complejidad en las fracciones, menor la actividad hipoglucemiante inducida. Asimismo, es posible que los compuestos reportados por

dichos autores no se encontraran totalmente puros, de forma que aún se observó efecto hipoglucémico.

Si bien los compuestos identificados  $\beta$  sitosterol y su glucósido, estigmasterol, los ácidos ursólico, oleanólico, hexadecenóico, arabinónico y bassico, el glucósido del ácido absísico, la friedelina y el myoinositol- no fueron evaluados con respecto a su efecto hipoglucémico, en la mayoría de ellos se cuenta con evidencia de interesante actividad farmacológica diversa, incluso en pruebas clínicas, como se describe posteriormente.

En los vegetales, el  $\beta$  sitosterol y el estigmasterol constituyen los principales y más abundantes esteroides. El  $\beta$  sitosterol así como su glucósido, son atrapadores de radicales libres y disminuyen la peroxidación en lípidos (van Rensburg, 2000). Se ha demostrado también una importante actividad protectora contra úlceras gástricas en un modelo murino, los autores proponen que el mecanismo de acción podría involucrar la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Navarrete et al., 2002). La actividad inmunomoduladora incluye la promoción de la proliferación de células T estimuladas con dosis subefectivas de fitoalexinas. Tal actividad se potencia cuando  $\beta$  sitosterol y su glucósido se combinan, aumentando la excreción de IL-2 e interferón  $\gamma$ . Por otro lado, se ha reportado la actividad hipoglucemiante y sinérgica del  $\beta$  sitosterol y estigmasterol (p.o.) en ratas pretratadas con aloxana. Con una dosis de 100 mg/kg de una mezcla 66-34%, la glucemia disminuyó 83% (Jamaluddin et al., 1994). En pacientes moderadamente hipercolesterolémicos, la ingesta de 10 g de un preparado de proteína de soya:  $\beta$  sitosterol (4:1), durante 40 días, disminuyó 15% la relación LDL-C (Cicero, et al., 2002). En otro reporte de un ensayo clínico en condiciones de hipercolesterolemia severa, la adición de  $\beta$  sitosterol a un tratamiento

con lovastatina disminuyó en mayor grado las concentraciones de colesterol y LDL, con respecto a pacientes tratados únicamente con lovastatina, (Werner et al., 1996). También se ha reportado actividad antiinflamatoria y antipirética del  $\beta$  sitosterol (Gupta et al., 1996).

El estigmasterol se ha reportado como compuesto mayoritario, además del escualeno y  $\beta$  sitosterol, en la especie con actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria *Sideritis taurica* (Aboutabl et al., 2002). Igualmente, se ha encontrado efecto hipoglucémico sinérgico entre estigmasterol y  $\beta$  sitosterol en ratas aloxanisadas (Jamaluddin et al., 1994). Este compuesto funciona como antiinflamatorio en modelos murinos (Capasso et al., 1983; Gómez et al., 1999), también se ha reportado efecto citotóxico a partir de la inhibición de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en células hiperplásicas (Hirano et al., 1994); Andrikopoulos y colaboradores (2002) reportaron que el estigmasterol, entre otros, disminuye la oxidación en LDL inducida por  $\text{Cu}^{++}$ .

El ácido 9-hexadecenoico (palmitoléico) ha sido reportado en diversas especies de bacterias del género *Nocardia* (*N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. lurida* y *N. rugosa*) (Bordet y Michel, 1963). En un estudio en el que se implantaron células tumorales de Ehrlich en ratones, el ácido prolongó la sobrevivencia a dosis de 37.5–150 mg/kg/día durante 10 días; asimismo, el tratamiento disminuyó significativamente el patrón lipídico de las células tratadas (Ito et al., 1982). Hayatsu et al., (1988) menciona al ácido palmitoléico como antimutagénico.

El ácido ursólico (AU), un triterpeno pentacíclico, ha sido aislado de muchas especies vegetales como *Eriobotrya japónica*, especie con actividad hipoglucemiante (Choi et al., 2000). AU mostró efecto preventivo al fotoenvejecimiento dérmico (Lee et al.,



2003) y antioxidante, al prevenir la aparición de cáncer químico y de piel en ratones (Slaga 1995, a,b) y cáncer de próstata (Subbaramaiah, 2000). Ha funcionado también como antagonista de TGF-1, lo cual está relacionado con actividad antiproliferativa (Murakamia, 2004). Mizushina et al., (2000) demostraron que AU inhibe selectivamente las DNA polimerasas a y b así como las topoisomerasas I y II humanas. La actividad antiinflamatoria es reportada por Subbaramaiah (2000), así como la estimulación de la producción de NO y TNF  $\alpha$ , lo cual explica en parte la actividad antitumoral e inmunomoduladora referidas (Youa HJ, et al., 2001). Cárdenas y colaboradores (2004), reportan el efecto del AU en diferentes etapas importantes de la angiogénesis *in vitro*; así, inhibió la proliferación, migración y diferenciación de células endoteliales, aunque al mismo tiempo promovió la degradación de la matriz extracelular; también inhibe selectivamente la apoptosis (Choi et al., 2000). Se han reportado además efectos antimicrobianos, antivirales (Sattar et al., 1995) y anti *Candida* (Zaletova et al., 1987).

El ácido oleanólico (AO) es el isómero del AU, en un reporte reciente Shih et al., (2004) establecen que AO disminuye con una relación dosis-dependiente la toxicidad provocada por kainato en cultivos primarios de hipocampo de rata, manteniendo el potencial de membrana mitocondrial, disminuyendo y atrapando radicales libres y modulando al receptor AMPA. Por otro lado, Rodríguez y colaboradores, (2003) reportan que el AO promueve la recuperación de lesiones gástricas crónicas provocadas por ácido acético en animales experimentales.

En pruebas en las que se utilizaron tanto AU como AO se encontró una potente actividad hipoglucemiante, antihiperlipemiante (antiaterosclerótica) y antioxidante en ratas hipertensas espontáneas e insulino resistentes, de la cepa DSS (Dahl Salt-



sensitive), de tal forma que su administración después de un tratamiento diario por 6 semanas (i.p., 60 mg/kg), normalizó todos los parámetros metabólicos cuantificados (glucemia, concentración de HDL y LDL, triglicéridos, glutathion peroxidasa y superóxido-dismutasa) (Somova et al., 2003a). Los mismos autores, utilizando un diseño experimental similar, reportan además un efecto diurético, natriurético y salurético que dan por resultado actividad antihipertensiva (Somova et al., 2003b). Del mismo modo AO y AU muestran efectos inhibitorios a reacciones catalizadas por enzimas del complejo del citocromo P-450 en microsomas hepáticos humanos; el citocromo P-450 participa en diversas acciones, desde el metabolismo de ácidos grasos, colesterol y esteroides, así como la transformación y detoxificación de fármacos diversos, carcinógenos y otros xenobióticos (Kim et al., 2004). Se ha reportado también a estos compuestos como inhibidores del crecimiento en etapa de promastigote de *Leishmania* a una  $CI_{50}$  de 27  $\mu\text{g/ml}$  en el caso del AU y de 11  $\mu\text{g/ml}$  para AO (Torres-Santos et al., 2004). Somova y colaboradores, (2004), reportan que los productos son cardiotónicos y antidisrítmicos con un efecto similar al propanolol, por lo que es probable que funcionen como antagonistas  $\beta$  adrenérgicos. Se ha demostrado, en ratones, una importante actividad inmunoestimuladora sin efectos adversos, en los que se incrementó la cantidad de glóbulos blancos y el conteo y diferenciación de células madre totales en médula espinal; además, aumentó el número de células  $\alpha$  esterasea positivas, los anticuerpos circulantes y en bazo, y disminuyó la reacción de hipersensibilidad (Raphael y Kutan, 2003).

El triterpeno insaturado denominado ácido bassico, ha sido reportado como un producto común en sapotáceas (Nobrega, et al., 1985). El compuesto, aislado de *Bumeli sartorum*, incrementó significativamente la captación de glucosa y la síntesis

de glucógeno en diafragma aislado de rata; también se reportó la actividad hipoglucemiante en animales pretratados con aloxana, modificando la glucemia en pruebas de curso temporal y curva de tolerancia, en estos mismos animales aumentó la concentración de insulina, por lo que es posible que actúe como secretagogo (Ramnath et al., 1991).

De la friedelina, se ha reportado actividad antitumoral en las líneas celulares humanas U251 (SNC) y PC3 (próstata) (Reyes-Chilpa et al., 2004).

Por otro lado, el myoinositol funciona en el metabolismo como fosfatidilinositol, el cual desempeña un papel estructural en las membranas, es fuente de ácido araquidónico para la biosíntesis de eicosanoides y por sí mismo, es un mediador de respuestas celulares diversas. Se ha reportado que fosfoglicanos de inositol provenientes de *Plasmodium yoelii* inducen hipoglucemia hasta a las 6 horas de su administración en animales sanos o con hiperglucemia moderada por la administración de STZ, Elased (2001) y su equipo postulan que estos productos podrían actuar como segundos mensajeros en la acción de la insulina. Un derivado del myoinositol, D-myoinositol-1,2,6-trisfosfato (PP56), al ser coadministrado con el neuropéptido Y (NPY) inhibe la secreción de insulina en células  $\beta$  pancreáticas (Ahrén, 1992).

Del ácido absísico o sus derivados no se ha establecido relación con actividad hipoglucemiante; sin embargo, es posible que moléculas de este tipo, al ser fitorreguladores, actúen como señales moduladoras del metabolismo en mamíferos. La glucosa es la fuente energética principal y el precursor biosintético más importante en los vegetales y al igual que en los animales, se almacena y moviliza bajo controles hormonales. Es así que se ha demostrado que los fitorreguladores,



ácido 3-indolacético, el L-triptofano y el ácido p-clorofenoxiacético, inhiben la insulina *in vitro*, *in vivo* inducen hipoglucemia en ratas sanas. Productos del metabolismo vegetal como los ácidos nicotínico y antranílico inhiben la insulina e incrementan simultáneamente la acción de insulina administrada (Álvarez, 1998).

Con respecto al efecto sobre la concentración de lípidos observada en los pacientes diabéticos, existen algunas especies con actividad hipolipemiente reportada, como *Hibiscus rosa sinensis* cuyos extractos, obtenidos a partir de estructuras florales, reducen tanto la concentración de colesterol como la de triglicéridos en ratas pretratadas con STZ (Sachdewa and Khemani, 2003); los extractos acuosos de *Eugenia uniflora* mejoran la hipertrigliceridemia (Arai et al., 1999); el guggulípido un preparado ayurvédico de *Commiphora mukul*, disminuye el colesterol en humanos (Urizar et al., 2002). *Momordica charantia* y *Ginseng spp* producen efecto hipolipemiente e hipotrigliceridemiante. Por otro lado, se ha demostrado actividad hipolipemiente de la pectina, de la que además se ha señalado que incrementa la excreción de ácidos biliares.

Los mecanismos posibles para explicar el efecto hipolipemiente son: a) la inhibición de la absorción del colesterol, como en el caso del ezemitibe (van Heek et al., 2001), b) acción o efecto similar a estatinas, c) inhibición del receptor de ácidos biliares (Urizar et al, 2002), d) el aumento en la transformación del colesterol a sales biliares y su final excreción e) la estimulación de la actividad de la 3-hydroxy-3-metilglutaril coenzima A reductasa (Baker, 1994). La actividad hipotrigliceridemiante en particular puede explicarse por mecanismos tipo fibratos como a) aumento en la lisis de lipoproteínas b) la inducción en la asimilación de ácidos grasos por el hígado, así como la disminución de la lipólisis hepática, c) la disminución de LDL por aumento de



su catabolismo y d) aumento en la expresión y producción de HDL (Staels et al., 1998).

Con respecto a los compuestos aislados, dado su diverso e interesante conjunto de actividad biológica, podrían ser útiles farmacóforos para el desarrollo de agentes alternos hipoglucemiantes e hipolipemiantes, entre otros, y de gran utilidad particularmente para el manejo del síndrome dismetabólico el cual afecta al 21.4% de la población mexicana, de acuerdo con criterios diagnósticos del National Cholesterol Education Program (Aguilar-Salinas et al., 2004).

Dado que las pruebas toxicológicas en roedores indican que el extracto aún administrado en dosis de 3 g/kg es inocuo y ya que la especie es utilizada de manera cotidiana por la población, la administración de *C. obtusifolia* es segura.

La infusión preparada a partir del fitofármaco estandarizado de *C. obtusifolia*, mostró ser terapéuticamente segura ya que la tasa de efectos secundarios, leves y pasajeros, fue menor a la obtenida con el extracto de *M. vulgare*, utilizado como placebo. La actividad biológica del fitomedicamento incluye los efectos hipoglucémico, hipotrigliceridémico e hipocolesterolémico. La concentración de colesterol en el grupo tratado con el fitofármaco alcanzó niveles plasmáticos de 206 mg/dl, cercanos al ideal de 200 mg/dl. Compuestos del tipo de las glitazonas tienen la habilidad de disminuir la concentración de colesterol total; este efecto, como ha sido ampliamente demostrado en la literatura, disminuye el riesgo para la aparición de complicaciones microvasculares y cardíacas que se encuentran a su vez entre las más graves y preocupantes consecuencias del síndrome.

## X. CONCLUSIONES

Con base en los ensayos en los que se evaluó la actividad biológica de la especie vegetal *Cecropia obtusifolia* Bertol. se concluye que:

- 1) Los extractos metanólico y acuoso poseen actividad hipoglucemiante en ratones sanos.
- 2) La actividad hipoglucemiante de las fracciones solubles en agua (EM-6 y EA-5) son superiores a las observadas al administrar las fracciones de mayor pureza.
- 3) Las fracciones de mayor polaridad del extracto metanólico no inducen actividad hiperglucemiante, a diferencia del extracto íntegro.
- 4) La administración, p.o. de 3 g/kg de peso corporal, del extracto metanólico en ratones no indujo efectos tóxicos.
- 5) Se demostró la presencia de los ácidos ursólico, oleanólico y bassico, además de estigmasterol,  $\beta$  sitosterol y su glucósido, y ácido clorogénico como compuestos mayoritarios del extracto metanólico.
- 6) Fueron identificados los ácidos arabinónico, 9-hexadecenónico, glucosa, myoinositol, friedelina, y el glucósido del ácido absísico, como constituyentes mayoritarios del extracto acuoso.
- 7) El fitofármaco formulado a partir del extracto acuoso de *C. obtusifolia* y estandarizado en ácido clorogénico disminuyó significativamente la hiperglucemia en ayuno de pacientes con DM2, después de su administración por 21 días.



- 8) El fitofármaco elaborado con *C. obtusifolia*, además de actividad hipoglucemiante, presentó interesantes efectos hipolipemiantes en pacientes diabéticos con pobre control metabólico.

## XI. PERSPECTIVAS

- ✚ Estandarizar el material vegetal de *C. obtusifolia* con base en su contenido de ácido clorogénico y alguno(s) más de los compuestos mayoritarios aquí identificados.
- ✚ Establecer una parcela experimental con material obtenido por micropropagación y evaluar la actividad hipoglucemiante de los individuos generados.
- ✚ Diseñar un estudio estacional con ejemplares adaptados de *C. obtusifolia* para evaluar la producción de los compuestos en los que se estandarizará el fitofármaco y elegir la mejor época y condiciones de colecta.
- ✚ Realizar un estudio toxicológico de administración crónica del material vegetal generado en la parcela experimental.
- ✚ Diseñar un estudio clínico con un extracto estandarizado en por lo menos 2 compuestos mayoritarios de *C. obtusifolia* en el que se evalúe el efecto del fitofármaco sobre diversos parámetros del metabolismo de lípidos, en pacientes con diabetes tipo 2.
- ✚ Dilucidar los mecanismos subyacentes a la actividad hipolipemiante de los extractos de *C. obtusifolia*.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboutabl EA, Nassar MI, Elsakhawy FM, Maklad YA, Osman AF, El-Khrisy EAM; 2002; Phytochemical and pharmacological studies on *Sideritis taurica* Stephan ex Wild; J Ethnopharmacol; 82: 177-184.

Aguilar-Bryan L, Clement JP IV, González G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J; 1998; toward understanding the assembly and structure of KATP channels; Physiol Rev; 78: 227-245.

Aguilar CA, Xolalpa MS; 2002; La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes; Ciencia; 53(3): 24-35.

Aguilar-Salinas CA, Velásquez MO, Gómez-Pérez FJ, González Chávez A, Lara EA, Molina CV, Rull-Rodrigo JA, Tapia CR; 2003; Characteristics of patients with type 2 diabetes in México: results from a large population-based nationwide survey; Diabetes Care; 26: 2021-2026.

Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Valles V, Ríos-Torres JM, Franco A, Olaiz G, Rull JA, Sepúlveda J; 2004; High Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico; Arch Med Res; 35: 76–81

Ahmed AM; 2002; History of diabetes mellitus; Saudi Medical Journal; 23: 373-378.

Ahrén B; 1992; Inhibitory effect of D-myo-inositol-1,2,6-trisphosphate on glucose-stimulated insulin secretion in the mouse; Neuropeptides; 21: 163-166

Alpízar SM; 1999; Guía técnica para la detección de la Diabetes Mellitus; IMSS, México.

Alpízar SM, Sotomayor A, Castro MA, Zárate A, Madrazo Navarro M; 1999; Diabetes mellitus, prioridad institucional; Salud comunitaria; 2(1): 31-35.



Álvarez Berber LP; 1998; Determinación de la estructura molecular y evaluación farmacológica preliminar de los constituyentes químicos presentes en las plantas hipoglucemiantes *Bidens pilosa* y *Eysenhardtia polystachya*; Tesis Doctoral; Universidad Autónoma de México.

Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H; 2001; Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats; J Ethnopharmacol; 78: 145-149.

Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papageorgiou VP; 2002; Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against *in vitro* low-density lipoprotein oxidation; J Med Food; 5: 1-7.

Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, Arisawa M, Momose Y; 1999; Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. J Ethnopharmacol; 68: 307-314.

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: 2470-2471.

Argueta VA; 1994; Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana; Instituto Nacional Indigenista; México, pp 1365-1366.

Baker RA; 1994; Potential dietary benefits of citrus pectin and fiber; Food Technol; 48: 133-9.

Barceló A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S; 2003; The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean; Bulletin of the World Health Organization, 81(1): 19-28.

Bordet C, Michel G; 1963; Étude des acides gras isolés de plusieurs espèces de *Nocardia* ; Biochim Biophys Acta; 70: 613-26.

Burtis CA, Ashwood ER eds; 1999; Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed, Saunders Company, USA, pp 781, 839, 1240-1250.



Caballero-George C, Vanderheyden PM, Solis PN, Pieters L, Shahat AA, Gupta MP, Vauquelin G, and Vlietinck AJ; 2001; Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques; *Phytomedicine*; 8: 59-70.

Campbell IW; 2000; Antidiabetic drugs present and future: will improving insulin resistance benefit cardiovascular risk in type 2 diabetes mellitus?; *Drugs*; 60: 1017-1028.

Capasso F, Cerri R, Morrica P, Senatore F; 1983; Chemical composition and anti-inflammatory activity of an alcoholic extract of *Teucrium polium* L; *Boll Soc Ital Biol Sper*; 59: 1639-43.

Cárdenas C, Quesada AR, Medina MA; 2004; Effects of ursolic acid on different steps of the angiogenic process; *Biochem Biophys Res Commun*; 320: 402-408.

Cehade JM, Mooradian AD; 2000; A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus; *Drugs*; 60: 96-113.

Choi BM, Park R, Pae HO, Yoo JC, Kim YC, Jun CD, Jung BH, Oh GS, So HS, Kim YM, Chung HT; 2000; Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells; *Pharmacol Toxicol*; 86: 53-58.

Choi YH, Baek JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND, Kim KW; 2000; Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells; *Int J Oncol*; 17: 565-571.

Cicero AFG, Fiorito A, Panagiota PM, Sangiorgi Z, Gaddi A; 2002; Effects of a new soy/beta-sitosterol supplement on plasma lipids in moderately hypercholesterolemic subjects; *J Am Diet Assoc*; 102: 1807-1811.

Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C,





Hue L, Schurmans S; 2001; The lipid phosphatase SHIP2 control insulin sensitivity; Nature; 409: 92-97.

Cruz M, Montoya C, Gutiérrez M, Wachter NH, Kumate J; 2002; Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2; Rev Med; 40: 113-125.

Diabetes Prevention Program Research Group; 2002; Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin; N Engl J Med; 346: 393-395.

Diamant M, Heine RJ; 2003; Thiazolidinediones in Type 2 Diabetes Mellitus; Drugs; 63: 1373-1405.

Diamond J; 2003; The double puzzle of diabetes; Nature; 423: 599-602.

Donnelly R, Emslie-Smith AM, Gardner ID, Morris AD; 2000; A B C of arterial and venous disease vascular complications of diabetes; BMJ; 320: 1062-1066.

Elased KM, Gumaa KA, de Souza JB, Rahmoune H, Playfair JHL, Rademacher TW; 2001; Reversal of type 2 diabetes in mice by products of malaria parasites II. Role of inositol phosphoglycans (IPGs); Mol Genet Metab; 73: 248-258

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan C-C, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML, Kennedy BP; 1999; Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene; Science; 283: 1544-1548.

Enç FY, Imeryuz N, Akin L, Turoglu T, Dede F, Haklar G, Tekesin N, Bekiroglu N, Yegen BÇ, Rehfeld JF, Holst JJ, Ulusoy NB; 2001; Inhibition of gastric emptying by acarbose is correlated with GLP-1 response and accompanied by CCK release; Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 281: 752-763.

Farnsworth NR; 1993; Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience; J Ethnopharmacol; 38: 145-52.



Godfrey KM, Barker DJP; 2000; Fetal nutrition and adult disease; Am. J. Clinical Nutrition; 71: 1344-1352.

Gómez MA, Sáenz MT, García MD, Fernández MA; 1999; Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models; Z Naturforsch [C]; 54: 937-41.

Gupta MP; 1995; 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas; Santa Fe de Bogotá, pp 405-406.

Gupta MB, Nath R, Srivastava N, Shanker K, Kishor K, Bhargava KP; 1996; Anti-inflammatory and antipyretic activities of  $\beta$ -sitosterol; Int J Immunopharmacol; 18: 693-700.

Güven S, Kuenzi J; 1998; Diabetes Mellitus. In: Mattson PC; Pathophysiology, 5th ed, Ed. Lippincott, Philadelphia, pp 805-828.

Harvey A; 2000; Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products; Drug Discov Today; 5: 294-300.

Hayatsu H, Arimoto S, Negishi T; 1988; Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis; Mutat Res; 202: 429-446.

van Heek M, Austin TM, Farley C, Cook JA, Tetzloff GG, Davis HR; 2001; Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, normalizes combined dyslipidemia in obese hyperinsulinemic hamsters. Diabetes; 50: 1330-1335.

Hernández AM, Olaíz FG; 2002; La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública; Ciencia; 53(3): 8-17.

Hernández-Galicia E, Aguilar-Contreras A, Aguilar-Santamaría L, Román-Ramos R, Chávez-Miranda AA, García-Vega LM, Flores-Sáenz JL, Alarcón-Aguilar FJ; 2002; Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants; Proc West Pharmacol Soc; 45: 118-124.

Hersch-Martínez P; 1997; Medicinal plants and regional traders in México: physiographic differences and conservational challenge; *Econ Bot*; 51: 107-120.

Hirano T, Homma M, Oka K; 1994; Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of the benign prostatic hyperplasia; *Planta Med*; 60: 30-33.

Hiriart M; 2002; La historia natural de la diabetes; *Ciencia*; 53(3): 4-7.

Huopio H, Shyng SL, Otonkoski T, Nichols CG; 2002; KATP channels and insulin secretion disorders; *Am J Physiol*; 283: E207-E216.

Ito H, Kasama K, Naruse S, Shimura K; 1982; Antitumor effect of palmitoleic acid on Ehrlich ascites tumor; *Cancer Lett*; 17: 197-203 .

Ivorra MD, Payá M, Villar A; 1989; a review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs; *J Ethnopharmacol*; 27: 243-275.

Jamaluddin F, Mohamed S, Lajis N; 1994; Hypoglycaemic effect of *Parkia speciosa* seeds due to the synergistic action of beta-sitosterol and stigmasterol; *Food Chemistry*; 49: 339-345.

Kadowaki T; 2000; Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models; *J Clin Inv*; 106: 459-464.

Kahn BB; 1996; Glucose transport: pivotal step in insulin action; *Diabetes*; 45: 1644-1654.

Kaufman FR; 2002; Type 2 diabetes in children and youth: a new epidemic; *J Pediatr Endocrinol Metab*; 15: 737-44.

Kay TW, Thomas HE, Harrison LC, Allison J; 2000; The beta cell in autoimmune diabetes: many mechanisms and pathways of loss; *Trends Endocrinol Metab*; 11: 11-15.



Kim KA, Lee JS, Park HJ, Kim JW, Kim CJ, Shim IS, NJ Kim, Han SM, Lim S; 2004; Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes; Life Sci; 74: 2769–2779.

Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, Sharpe AH, Stricker-Krongrad A, Shulman GI, Neel BG, Kahn BB; 2000; Increased energy expenditure, decreased adiposity and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice; Mol Cell Biol; 20: 1479-1489.

Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, Saint-Pierre J, Grey ST, Lowell BB; 2003; Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic cell dysfunction. J Clin Invest; 112: 1831-1842.

Lee YS, Jinb DQ, Beakb SM, Lee ES, Kimb JA; 2003; Inhibition of ultraviolet-A-modulated signaling pathways by asiatic acid and ursolic acid in HaCaT human keratinocytes; Eur J Pharmacol; 476: 173-178.

Ling-Hua Z, Pei-Gen X; 1993; Recent advances in studies of antihyperlipaemic and antihyperglycaemic compounds from Chinese traditional and herbal medicines; Phytother Res; 7: 217-226.

Lozoya X, Aguilar A, Camacho JR; 1987; Encuesta sobre el uso actual de las plantas en la medicina tradicional Mexicana; Rev Med; 25: 283-291.

Lozoya-Meckes M, Mellado-Campos V; 1985; Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy?; J Ethnopharmacol; 14: 1-9.

Martens FMAC, Visseren FLJ, Lemay J, Koning EJP, Rabelink TJ; 2002; Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones; Drugs; 62: 1463-1480.

Mellado V, Lozoya M; 1984; Effect of the aqueous extract of *Cecropia obtusifolia* on the blood sugar of normal and pancreatectomized dogs; Int J Crude Drug Res; 22: 11-16.



Meckes M, Garduño-Ramírez ML, Marquina S, Alvarez L; 2001; Iridoides adicionales de la planta medicinal *Astianthus viminalis* y su actividad hipoglucemiante y antihiperoglucemiante; Rev Soc Quím Méx; 45: 95-199.

Missouri Botanical Garden; Nomenclatural data base. Disponible en: <http://www.mobot.mobot.org> Acceso 28 de abril del 2003.

Mizushima Y, Iida A, Ohta K, Sugawara F, Sakaguchi K; 2000; Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase; Biochem J; 350: 757-763.

Moller DE; 2001; New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome; Nature; 414: 821-827.

Murakami S, Takashima H, Sato-Watanabe M, Chonan S, Yamamoto K, Saitoh M, Saito S, Yoshimura H, Sugawara K, Yang J, Gao N, Zhang X; 2004; Ursolic acid, an antagonist for transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1; FEBS Lett; 566: 55–59.

Navarrete A, Trejo-Miranda JL, Reyes-Trejo L; 2002; Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity; J Ethnopharmacol; 79: 383–388.

Nobrega AR, Barbosa FJM, Ramnath NS; 1985; Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *Bumelia sartorum*; J Ethnopharmacol; 14: 173-185.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001; Test Guideline 423: Acute oral toxicity - Acute toxic class method. Adopted December 2001.

Ortiz Sandoval S; 2003; Evaluación de la actividad hipoglucemiante y cuantificación de ácido clorogénico en especies de *Cecropia*; Tesis de Licenciatura; Instituto Tecnológico de Zacatepec.

Patlak M; 2002; New Weapons to Combat an Ancient Disease: Treating Diabetes FASEB J; 16: 1853-1866.



Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ; 2003; Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1; Proc Natl Acad Sci; 100: 8466-8471.

Pérez-Guerrero C, Herrera MD, Ortiz R, Álvarez SM, Fernández MA; 2001; A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract; J Ethnopharmacol; 76(3): 279-84.

Pérez RM, Ocegueda ZA, Muñoz L JL, Ávila AJG, Morrow WW; 1984; A study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants; J Ethnopharmacol, 12: 253-262.

Pérez RM, Zavala SMA, Pérez GS, Pérez GC; 1998; Antidiabetic effect of compounds isolated from plants; Phytomedicine, 5: 55-75.

Pessin JE, Saltiel AR; 2000; Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance; J Clin Invest; 106: 165-169.

Poitout V, Robertson RP; 2002; Minireview: Secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity; Endocrinol; 143: 339-342.

Pyke DA; 1997; The history of Diabetes; In International textbook of diabetes mellitus; KGMM Alberti, Zimmet P, DeFronzo RA (ed).; Wiley & Sons, 2d ed; Chichester.

Ramnath NS, Barbosa FJM, Nilkanth DJ, Deshmukh V; 1991; Probable mechanism of hypoglycemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*; J Ethnopharmacol; 33: 37-44.

Raphael TJ, Kuttan G; 2003; Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system; Phytomedicine; 10: 483-489.



Reaven GM; 1988; Role of insulin resistance in human disease; *Diabetes*; 37: 1595-1607.

van Rensburg, SJ, Daniels WMU, van Zyl JM, Taljaard JJF; 2000; A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydro-epiandrosterone sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation; *Metab Brain Dis*; 15(4): 257-265.

Reyes-Chilpa R, Estrada-Muníz E, Ramírez AT, Amekraz B, Aumelas A, Jankowski CK, Vázquez-Torres M; 2004; Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*; *Life Sci* 75: 1635–1647.

Rodríguez JA., Astudillo L, Schmeda-Hirschmann G; 2003; Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats; *Pharmacol Res*; 48: 291-294.

Román-Ramos R, Alarcón-Aguilar F, Lara-Lemus A, Flores-Saenz JL; 1991; Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants; *Arch Invest Med*; 22: 87-93.

Román-Ramos R, Alarcón-Aguilar F, Lara-Lemus A, Flores-Saenz JL; 1992; Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch Med Res*; 23: 59-64.

Sachdewa A, Khemani LD; 2003; Effect of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. *J Ethnopharmacol*; 89: 61-66.

Saladin KS, 1998, *Anatomy & Physiology: The unity of form and function*, Ed Mc Graw-Hill, U.S.A., pp 140-166.

Saltiel AR; 2001; New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes; *Cell*; 104: 517-529.



Saltiel AR, Kahn CR; 2001; Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism; Nature; 414: 799-806.

Sattar A, Bankova V, Kujumgiev A, Galabov A, Ignatova A, Todorova C, Popov S; 1995; Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants; Pharmazie; 50: 62-65.

Scheen AJ; 2003; Current management strategies for coexisting diabetes mellitus and obesity; Drugs 63: 1165-1184.

Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx> Acceso 28 abril del 2003.

Shih Y-H, Chein Y-Ch, Wang J-Y, Fu Y-S; 2004; Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats; Neurosci Lett; 362: 136-140.

Slaga TJ; 1995a; Inhibition of skin tumor initiation, promotion, and progression by antioxidants and related compounds; Crit Rev Food Sci Nutr; 35: 51-57.

Slaga TJ; 1995b; Inhibition of the induction of cancer by antioxidants; Adv Exp Med Biol; 369: 167-174.

Somova LO, Nadar A, Rammanan P, Shode FO; 2003a; Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension; Phytomedicine; 10: 115-121.

Somova LI, Shode FO, Ramnanan P, A Nadar; 2003b; Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves; J Ethnopharmacol; 84: 299-305.

Somova LI, Shode FO, Mipando M; 2004; Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol; Phytomedicine; 11: 121-129.





Staels B; Dallongeville J; Auwerx J; Schoonjans K; Leitersdorf E; Fruchart J; 1998; Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism; *Circulation*; 98: 2088-2093.

Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ; 2000; Ursolic acid inhibits cyclo-oxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells; *Cancer Res*; 60: 2399-2404.

Terrés-Speziale AM; 2002; Confiabilidad y aplicabilidad de los nuevos criterios internacionales para el diagnóstico de diabetes mellitus; *Rev Mex Patol Clin*; 49: 212-220.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; 2003; Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; *Diabetes Care*, 26: 5-20.

The World Medical Association. Disponible en: <http://www.wma.net/s/policy/b3.htm>  
Acceso 26 de agosto del 2004.

Torres-Santos EC; Lopes D; Rodrigues OR; Carauta JPP, Bandeira CAF, Kaplan MAC, Rossi-Bergmann B; 2004; Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*; *Phytomedicine*; 11: 114-120.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Aunola S, Cepaitis Z, Moltchanov V, Hakumaki M, Mannelin M, Martikkala V, Sundvall J, Uusitupa M, the Finnish Diabetes Prevention Study Group; 2001; Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance; *N Engl J Med*; 344: 1343-1350.

Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, Silva FV, Ordentlich P, Yan Y, Gonzalez FJ, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Moore DD; A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR; *Science*; 2002; 296: 1703-1706.



Velázquez MO, Lara EA, Tusie LMT, González CA, Martínez MM, Molina CV; 2002; Prevención primaria de la diabetes una necesidad para el siglo XXI; Vigilancia Epidemiológica; 19: 1-3.

Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH; 2001; IGF-I Treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming; Endocrinology; 142: 3964–3973

Vidrio H, García-Márquez F, Reyes J, Soto R; 1982; Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*; Pharm Sci; 71: 475-476.

Weissman P; 2002; Reappraisal of the pharmacologic approach to treatment of type 2 diabetes mellitus; Am J Cardiol; 90: 42G-50G.

Werner OR, Geiss HC, Sönnichsen AC, Schwandt P; 1996; Treatment of severe hypercholesterolemia with a combination of beta-sitosterol and lovastatin; Curr Ther Res; 57: 497-505.

White JR, Davis SN, Cooppan R, Davidson MB, Mulcahy K, Manko GA, Nelinson D; 2003; Clarifying the role of insulin in type 2 diabetes management; Clinical Diabetes; 21: 14-20.

White MF; 2002; IRS proteins and the common path to diabetes; Am J Physiol Endocrinol Metab; 283: 413-422.

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.

Withers RT, Smith DA, Tucker RC, Brinkman M, Clark DG; 1998; Energy metabolism in sedentary and active 49- to 70-yr-old women; J Appl Physiol; 84: 1333-1340.

Wright DC, Swan PM; 2001; Optimal exercise intensity for individuals with impair glucose tolerance; Diabetes Spectr; 14: 93-97.



Youa HJ, Choi ChY, Kim JY, Park SJ, Hahm K-S, Jeong HG; 2001; Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production via nuclear factor- $\kappa$ B activation in the resting macrophages; FEBS Lett; 509: 156-160.

Zaletova N, Shavlinskii A, Tolkacchaev O, Vichkanova S; Fateeva T, Krutikova N; 1987; Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity; Chemical Abstracts; 106: 18867e.

Zimmet P; 1999: Diabetes epidemiology as a trigger to diabetes research; Diabetologia; 42: 499-518.

Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J; 2001; Global and societal implications of the diabetes epidemic; Nature; 414: 782-787.



## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

(ANEXO I)

Lugar y fecha \_\_\_\_\_.

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación clínica titulado “EFECTO HIPOGLUCÉMICO DE LAS ESPECIES VEGETALES Manrubio y Guarumbo EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 DESCONTROLADA” registrado ante el Comité Local de investigación con el número \_\_\_\_\_. El objetivo de este estudio es comparar el efecto hipoglucémico del, *Cecropia obtusifolia* y *Marrubium vulgare* (placebo) en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 descontrolada.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, donde se me explicó que no se han documentado efectos adversos con la administración de estos y el beneficio es tratar de llevar la glucosa a un nivel lo más cercano a lo considerado normal.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaron a cabo, los riesgos, beneficios y cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente.

\_\_\_\_\_  
Nombre, matrícula y firma del investigador principal.

\_\_\_\_\_  
Testigo (Familiar responsable).

\_\_\_\_\_  
Testigo



ELSEVIER

SCIENCE @ DIRECT®

Phytomedicine ■ (■■■■) ■■■-■■■

Phytomedicine

www.elsevier.de/phymed

## Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics

A. Herrera-Arellano<sup>a,\*</sup>, L. Aguilar-Santamaría<sup>a</sup>, B. García-Hernández<sup>b</sup>, P. Nicasio-Torres<sup>a</sup>, J. Tortoriello<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social. Xochitepec, Morelos, México

<sup>b</sup>Instituto Mexicano del Seguro Social. Cuernavaca, Hospital General Regional No. 1, "Lic. Ignacio García Téllez", Morelos, México

Received 21 April 2003; accepted 12 January 2004

### Abstract

*Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* have been widely used in Mexican traditional medicine for the control of type 2 diabetes. In order to evaluate the clinical effect produced by the aqueous extract from these species on type 2 non-controlled diabetes mellitus, a total of 43 outpatients were included. Based on the European NIDDM (policy group) criteria, only patients with poor response to the conventional treatment were selected. All patients maintained their medical treatment and also received a prepared infusion of the dry leaves of the plant treatment for 21 days. In a double-blind manner, the patients were randomly grouped as follows: 22 patients were treated with *C. obtusifolia* and 21 with *M. vulgare*. The fasting blood glucose values were reduced by 15.25% on patients treated with *C. obtusifolia*, while cholesterol and triglycerides were decreased by 14.62% and 42.0%, respectively (ANOVA  $p < 0.02$ ). In the case of patients treated with *M. vulgare*, the plasma glucose level was reduced by 0.64% and cholesterol and triglycerides by 4.16% and 5.78%, respectively. When the results were compared between groups, significant differences in glucose and cholesterol diminution were found. The obtained results showed that the infusion prepared with the leaves of *C. obtusifolia* (containing  $2.99 \pm 0.14$  mg of chlorogenic acid/g of dried plant) produced beneficial effects on carbohydrate and lipid metabolisms when it was administered as an adjunct on patients with type 2 diabetes with poor response to conventional medical treatment.

© 2004 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Diabetes mellitus type 2; *Cecropia obtusifolia*; *Marrubium vulgare*; Antilipemic agent; Hypoglycemic agent

### Introduction

Type 2 Diabetes mellitus (DM) is one of the most common illnesses in the world. Worldwide, approximately 120 million people have diabetes and that could

double in 10 years. In Mexico, DM affects 8.2% of the population between 20 and 69 years old, and has the first place of mortality between chronic degenerative diseases and represents 16.7% of deaths (Secretaría de Salud, 2000).

DM is the main factor responsible for renal failure, blindness, and non-traumatic amputations; the association between type 2 diabetes with poor metabolic control and the high incidence of mortality due to

\*Corresponding author. Tel.: +52-777-361-21-94; fax: +52-777-361-21-55.

E-mail address: armandoha\_mx@yahoo.com.mx (A. Herrera-Arellano).

cardiovascular illness and nephropathy has been well demonstrated. Nevertheless, the adequate control of plasma glucose concentrations prevent micro-vascular complications. For these reasons the principal objectives of medical treatment in patients with DM the metabolic control (Donnelly et al., 2000).

The plant species *Cecropia obtusifolia* Bertol. commonly known as “guarumbo” and *Marrubium vulgare* L. popularly known as “marrubio” have been widely used in Mexican traditional medicine for the treatment of DM (Argueta et al., 1994). Previously, extracts prepared from leaves of *C. obtusifolia* have shown different pharmacological properties: hypoglycemic, antihypertensive, anti-inflammatory, analgesic, muscle relaxant and CNS depressant (Salas et al., 1987; Román et al., 1991; Perez-Guerrero et al., 2001). The hypoglycemic effect was demonstrated in rabbits and streptozotocin-induced diabetic rats. Recently, the flavone isoorientin as well as chlorogenic acid were identified as the main constituents in water and butanolic extracts (Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2001). With relation to *M. vulgare*, it has been reported that leaf extracts possess vasorelaxant, antioxidative, antiinflammatory, hypotensive, antispasmodic, antinociceptive, and hypoglycemic effects (El Bardai et al., 2003; VanderJagt et al., 2002; Sahpaz et al., 2002; El Bardai et al., 2001; De Jesus et al., 2000). The hypoglycemic effect was demonstrated in rabbits and alloxan-induced diabetic rats (Román et al., 1992; Novaes et al., 2001).

The main objective of the present work was to determine the effect produced by the oral administration of the aqueous extracts, prepared with the dried leaves from these plants, as adjunct treatment on type 2 diabetes.

## Materials and methods

The current study is a randomized, double-blind and controlled clinical trial. The patients were informed about the benefits and possible risks of the study; they could withdraw at any time during the trial for any personal reason, or if he or she developed an adverse reaction to the treatments. Signed informed consent was subsequently obtained from each patient. The Institutional Ethical Committee approved the study.

### Inclusion criteria

Outpatients from either sex with diagnosis of type 2 diabetes, with not more than 5 years evolution (30–60 years old) were selected. All patients must be under medical treatment, but showing fasting blood glucose  $\geq 140$  mg/dl, independently of cholesterol and triglycerides level.

### Exclusion criteria

Patients affected by diabetic complications or with clinical and biochemical data of nephropathy were not accepted. Also excluded were pregnant women, patients with diagnosis of gestational diabetes, insulin-dependent or type I diabetics, people who needed to travel frequently, and hospitalized patients.

### Plant material and drug preparation

During the summer of 1999 the fresh leaves from *C. obtusifolia* Bertol (Cecropiaceae) were collected from near Xalapa, Veracruz (Mexico) and *M. vulgare* L. (Labiatae) on Coajomulco, Morelos (Mexico); both were collected in a single occasion. The material was authenticated by Dr. Abigail Aguilar, IMSSM Herbarium Director, for which sample vouchers were stored for reference under the code numbers 13599 and 13601, respectively. For two weeks the leaves were dried under environmental temperatures and protected from direct light, and then milled. For blinding reasons, all plant materials (*C. obtusifolia* and *M. vulgare*) were packed individually into one gram filter-paper envelopes, with identical presentation and identified as treatments A and B. The codes were open only at the end of the clinical evaluations. Ethylene oxide was used for sterilization. The chromatographic analysis of the utilized infusions (see below) showed the presence of chlorogenic acid only in the *C. obtusifolia* extract ( $2.99 \pm 0.14$  mg/g of dried plant).

### Determination of chlorogenic acid content

Four infusions of each treatment were separately filtrated, and then dried with a rotary evaporator under reduced pressure. Once dry all products were defatted consecutively with 10 ml of hexane and 10 ml of chloroform. The final residues were dissolved in 20 ml of methanol and analyzed on a Merck Hitachi HPLC system, with an AS-2000A autosampler, an L-6200A intelligent pump system controller (DAD System Manager Software) and an L-4500 diode array detector. The samples were evaluated using a Chromolith RP-18e column  $100 \times 4$  mm (Merck) at  $25^\circ\text{C}$  with an isocratic mobile phase of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH=2.5): $\text{CH}_3\text{CN}$ : $\text{MeOH}$  (90:5:5), a flow rate of 1.4 ml/min and detection at 255 nm. The injection volume was 50  $\mu\text{l}$ . The retention time of chlorogenic acid (C3878-Sigma) was 5.5 min.

### Calibration curve

A standard solution was prepared using authentic chlorogenic acid from Sigma. Calibration curve was constructed with dilutions of 20, 40, 80 and 160  $\mu\text{g/ml}$  in

1 methanol. A volume of 50  $\mu$ l was injected and calibration  
2 curve was based on peak areas of the HPLC  
3 chromatograms. The calibration curve showed an  $R^2$  of  
4 0.996.

### 5 Adjunct treatment

6 All patients continued their medical treatment and  
7 dietary plan prescribed by their physician. In all cases  
8 the conventional drug prescribed was glibenclamide at  
9 dosage different.

### 10 Study design

11 A total of 43 patients from primary medical care of  
12 the IMSS General Hospital in Morelos, Mexico, were  
13 recruited during the last six months of 1999. Based on a  
14 random numbers table, the patients were distributed in  
15 one of the two treatment groups. They were informed  
16 and instructed about the normal procedure for drug  
17 preparation. Immediately before administering the drug,  
18 the patients were to prepare an infusion by introducing  
19 one of the envelopes in a cup boiling water for 5 min. For  
20 21 days this procedure was done three times a day,  
21 before every meal.

22 Before beginning and after finishing the treatment, the  
23 fasting determination of glucose, cholesterol, triglycer-  
24 ides, urea, creatinine and uric acid in blood were done.  
25 All biochemical determinations were done in an auto-  
26 matic equipment (Autolab) with standardized techni-  
27 ques by a certified external laboratory. In order to detect  
28 adverse reaction, the patients were evaluated every 7  
29 days. An inquiry was done, which included questions  
30 about 50 collateral effects and 5 grades of severity  
31 (patients could indicate any other side effect). In order  
32 to detect any possible complication, at the end of the  
33 first and second week of treatment, the fasting blood  
34 glucose was determined (by the research group) in all  
35 patients by using an electronic portable equipment and  
36 blood glucose electrodes (Precision Plus electrodes,  
37 Medisense Laboratories). Every week the treatment  
38 adherence was evaluated by counting the used dosages.  
39 When the treatment produced a decrease in the basal  
40 concentration of glucose, cholesterol or triglycerides by  
41 at least 25%, it was considered effective.

### 42 Statistical analysis

43 In order to determine the statistical significance of  
44 results, an analysis of variance (ANOVA) was applied in  
45 two ways. For the analysis of side effects as well as  
46 efficacy differences between treatments, a  $X^2$  test was  
47 done. Finally, the regression analysis was used for  
48 evaluating the effect of other variables—such as: gender,  
49 and body mass index (BMI)—upon the biochemical

50 variables. Values of  $p \leq 0.5$  were considered statistically  
51 significant.

52 Due to the lack of previous clinical data for the plants  
53 under study, no power calculation was carried out;  
54 therefore it is considered a pilot study.

### 55 Results

56 As illustrated in Table 1, a total of 43 patients were  
57 included and 76.74% were women. Twenty-two subjects  
58 received the treatment prepared with *C. obtusifolia* and  
59 21 were treated with *M. vulgare*. There were no  
60 significant differences between variables such as age,  
61 weight, height, BMI, doses of glibenclamide, SBP and  
62 DBP (ANOVA  $p > 0.10$ ).

63 As shown in Table 2, after 21 days of treatment, *C.*  
64 *obtusifolia* was able to reduce clinically and statistically  
65 the fasting blood glucose, serum cholesterol and  
66 triglycerides ( $p < 0.02$ ). When the differential effect  
67 produced by the 2 treatments was compared, only the  
68 reduction on fasting blood glucose showed significant  
69 differences; nevertheless, the cholesterol reduction was  
70 limitrophe (Table 3). That, could be attributed to the  
71 higher effect produced by *C. obtusifolia* in comparison  
72 with the extract from *M. vulgare*.

73 The comparison between the rates of therapeutic  
74 efficacy (reduction  $\geq 25\%$ ) produced by the treatments,  
75 showed that *C. obtusifolia* reach the higher effectiveness  
76 by reducing fasting blood glucose and serum cholesterol  
77 (Table 4).

78 The number and percentages of patients per group  
79 that showed slight side effects were as follows: *C.*  
80 *obtusifolia* 3 (13.6%) and *M. vulgare* 5 (23.81%). No  
81 statistical differences were found by  $X^2$  test. The side  
82 effects produced by *C. obtusifolia* were: excessive  
83 salivary flow, exhaustion and pyrosis; by *M. vulgare*  
84 were: nausea, oral dryness, sialorrhea, dizziness and  
85 anorexia. In the patients none of the treatments  
86 produced the adverse effects necessary for them to  
87 withdraw from the study.

88 The regression analysis did not show effect of gender  
89 and BMI on biochemical variables. All patients showed  
90 treatment adherence.

### 91 Discussion

92 The hypoglycemic effect produced by both species  
93 under evaluation has already been reported in animal  
94 models. *C. obtusifolia* decreased the blood glucose in  
95 healthy rabbits by 18.9% in a tolerance glucose test  
96 (Román et al., 1991), and *M. vulgare* reduce the blood  
97 glucose by 25.8% (Román et al., 1992). Recently,  
98 chlorogenic acid was identified as the active hypogly-

**Table 1.** General characteristics of patients at the beginning of the study

Parameter	<i>C. obtusifolia</i> (n = 22)				<i>M. vulgare</i> (n = 21)				ANOVA p
	Mean	SE	95% IC		Mean	SE	95% IC		
Age (years old)	50.68	1.57	47.39	53.96	50.76	1.74	47.11	54.40	0.97
Weight (kg)	66.81	1.76	63.12	70.49	65.12	2.37	60.15	70.08	0.57
Height (m)	1.53	0	1.53	1.53	1.55	0.01	1.52	1.57	0.55
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.23	0.78	26.58	29.87	27.01	0.76	25.41	28.60	0.28
Glibenclamide (mg/day)	13.40	0.89	11.53	15.26	13.80	0.96	11.79	15.80	0.77
SBP (mm Hg)	124.54	2.05	120.27	128.80	126.42	2.58	121.03	131.80	0.56
DBP (mm Hg)	77.72	1.76	74.05	81.38	81.66	1.63	78.25	85.06	0.10

**Table 2.** Effects produced by *C. obtusifolia* and *M. vulgare* upon different metabolic parameters in patients with type 2 diabetes

Group	Before treatment			After treatment			Difference			ANOVA p			
	Mean	SE	95% IC	Mean	SE	95% IC	Mean	SE	95% IC				
<i>C. obtusifolia</i>													
F B Glucose	250.94	11.88	226.22	275.65	212.65	13.60	226.22	275.65	38.28	13.20	10.80	65.75	< 0.02
Cholesterol	241.27	17.77	204.31	278.22	206.00	11.03	183.04	228.95	35.27	12.10	10.08	60.45	< 0.0001
Triglycerides	340.50	122.03	86.71	594.28	197.48	25.17	145.11	249.84	143.01	112.25	-90.43	376.45	< 0.02
Urea	25.85	1.43	22.87	28.82	24.84	1.58	21.53	28.14	1.01	1.15	-1.39	3.41	< 0.0002
Creatinine	0.70	0.02	0.63	0.76	0.71	0.02	0.66	0.75	-0.01	0.02	-0.06	0.04	< 0.003
Uric acid	3.48	0.32	2.80	4.15	3.65	0.28	3.06	4.23	-0.17	0.16	-0.52	0.18	< 0.0001
<i>M. vulgare</i>													
F B Glucose	252.16	13.85	223.25	281.06	250.53	13.15	223.09	277.96	1.62	10.93	-21.11	24.35	< 0.001
Cholesterol	204.80	10.92	182.01	227.58	196.23	7.81	179.93	212.52	8.57	7.16	-6.37	23.51	< 0.001
Triglycerides	151.13	10.68	128.84	173.41	142.39	13.95	113.28	171.49	8.73	9.45	-10.98	28.44	< 0.001
Urea	28.90	1.39	25.98	31.81	29.97	1.64	26.54	33.39	-1.06	1.56	-4.32	2.20	< 0.02
Creatinine	0.79	0.03	0.72	0.85	0.73	0.03	0.65	0.80	0.05	0.03	-0.01	0.11	< 0.004
Uric acid	3.06	0.23	2.57	3.54	3.10	0.23	2.61	3.58	-0.03	0.13	-0.31	0.25	< 0.001

Data are mg/dl.

**Table 3.** Comparison of differences on metabolic parameters before and after finishing the treatment

Parameter	<i>C. obtusifolia</i>				<i>M. vulgare</i>				ANOVA p
	Mean	ES	95% IC		Mean	ES	95% IC		
FB glucose	38.28	13.20	10.80	65.75	1.62	11.19	-21.72	24.96	0.04
Cholesterol	35.27	12.10	10.08	60.45	8.57	7.16	-6.37	23.51	0.06
Triglycerides	143.01	112.25	-90.43	376.45	8.73	9.45	-10.98	28.44	0.25
Urea	1.01	1.15	-1.39	3.41	-1.06	1.56	-4.32	2.20	0.28
Creatinine	-0.01	0.02	-0.06	0.04	0.05	0.03	-0.13	0.11	0.08
Uric acid	-0.17	0.16	-0.52	0.18	-0.03	0.13	-0.31	0.25	0.54

Values are mg/dl.

cemic compound in *C. obtusifolia* (Andrade-Cetto, 2001). In our work, the HPLC analysis showed the presence of this compound only in the *C. obtusifolia* extract ( $2.99 \pm 0.14$  mg/g of plant).

The ANOVA test showed significant differences between the hypoglycemic effect produced by the adjunct treatments employed: *C. obtusifolia* (15.25%)

and *M. vulgare* (0.64%). The hypoglycemic effect obtained with *C. obtusifolia* agree with that obtained by Román et al. (1991) in an animal model, in which, this plant reduced the blood glucose 18.9%. The effect produced by the extract from *M. vulgare* was minimal and disagrees with that reported before on healthy rabbits (Román et al., 1992).



**Table 4.** Comparison between rates of therapeutic efficacy (reduction  $\geq 25\%$ ) on type 2 diabetics treated as adjunct with *C. obtusifolia* and *M. vulgare*

	Therapeutic efficacy rate		$X^2$
	<i>C. obtusifolia</i>	<i>M. vulgare</i>	<i>P</i>
Glucosa	0.363	0.095	0.03
Cholesterol	0.181	0.000	0.04
Triglycerides	0.363	0.285	0.58

In relation to the therapeutic efficacy for reducing the fasting blood glucose (at least 25% reduction), *C. obtusifolia* produced the higher rates (36.6%) while *M. vulgare* reached that effect only in two of 21 patients (9.52%,  $p < 0.03$  on  $X^2$  test).

Other useful parameters for evaluating the metabolic control on diabetics are triglycerides and cholesterol (Rosen and Spiegelman, 2000). In the present study, the treatment with *C. obtusifolia* diminished the hypercholesterolemia from 241.27 to 206.0 mg/dl, reaching a therapeutic effect of 14.61% (ANOVA  $p < 0.0001$ ) and *M. vulgare* reduced the hypercholesterolemia by 4.18%. Considering the mean values, the group treated with *C. obtusifolia* reached a serum cholesterol value near 200 mg/dl, and that is considered the ideal value (Alberti and Gries, 1988). With regard to the hypocholesterolemic efficacy (at least 25% reduction of the basal values), *C. obtusifolia* reached the desired value in 18.1% of patients and *M. vulgare* did not show any improvement ( $X^2 p < 0.04$ ). In relation with triglycerides, *C. obtusifolia* decreased the basal hypertriglyceridemia from 340.5 to 197.48 mg/dl (42%) and the extract from *M. vulgare* reduced the basal values of triglycerides by 5.78%, but the differences were not significant. At the end of the study, the treatments maintained the mean of serum triglycerides below 200 mg/dl that in the base of the NIDDM Policy Group represents an acceptable control. For the hypotriglyceridemic efficacy (reduction  $\geq 25\%$ ) the treatment formulated with *C. obtusifolia* reached the highest rates, (36.6%), while *M. vulgare* produced the desired effect on 28.5%, but without reaching statistical differences.

The treatments evaluated in this study did not produce important modifications of the parameters that measure the renal function. The serum levels of creatinine and urea did not show pathologic alterations at the end of the study.

In some patients, the treatments produced only mild and temporary side effects, for which it was not necessary to interrupt the treatment.

The glyceamic control produced by *C. obtusifolia* in this study could be compared with the effect produced by *Zygophyllum gaetulum*; the administration of 1 g/kg per day of a decoction of the leaves from this plant

reduced the fasting blood glucose by 50% by the third week. However, it should be noted that the utilized doses of this plant were considerably higher (Jaouhari et al., 1999).

The hypoglycemic effect produced by *C. obtusifolia* as an adjunct treatment of glibenclamide on patients with non-optimal response to medical treatment was similar, but with lower magnitude, to that obtained on diabetics with secondary failure to sulfonylurea-metformin subjected to insulin therapy. In these patients, the fasting blood glucose and cholesterol was decreased (Lopez-Alvarenga et al., 1999). The effect on fast glucose produced by the latest example was higher than that obtained with the *C. obtusifolia* extract; nevertheless, it must be noted that the utilized doses of this plant was the lowest used in Mexican traditional medicine (3 g/day).

In yet another clinical study, on diabetics with sub-optimal metabolic control, who were treated with the maximum doses of sulfonylureas, the addition of metformin to the treatment during 12 weeks, reduced the fasting blood glucose by 25.75%, the serum cholesterol by 9.43%, and triglycerides by 11.07% (Mughal et al., 2000). In comparison with this study, the hypoglycemic effect produced by *C. obtusifolia* was lower than that produced by metformin (10 percentage points). However, the reduction produced by *C. obtusifolia* on serum cholesterol and triglycerides was increased by 5 and 31 percentage points, respectively.

It has been demonstrated that thiazoladinediones and glitazone decrease fasting blood glucose, cholesterol and triglycerides, and this may result in their potential ability to reduce macrovascular complications (Freie, 1999). The results obtained with *C. obtusifolia* resemble the effect produced by roglitazone (1–2 mg) or pioglitazone (30 mg/day). They were administered as an adjunct treatment of sulfonylureas on diabetics, in which, they were able to reduce the blood glucose concentration by 21% and 19.14%, respectively (Wolffenbittel et al., 2000; Yamasaki et al., 1997).

All these results show that the antihyperglycemic effect produced by *C. obtusifolia*, at the prescribed dose, is lower than that produced by insulin, metformin and glitazones. Nevertheless, one must consider that it was evaluated as a crude extract, with a similar preparation used in traditional medicine. An enriched extract, with active compounds (i.e. chlorogenic acid) in higher concentrations, should increase the potency of this plant species.

In spite of the small sample size included in the study, we can conclude that the aqueous extract from *C. obtusifolia* as an adjunct treatment, possesses an interesting pharmacological effect on type 2 diabetics with poor metabolic control. It was able to significantly reduce ( $p \leq 0.04$ ) the fasting blood glucose, in comparison with *M. vulgare*-treated group, while the total

1 serum cholesterol and triglycerides were diminished,  
3 with only mild and limited side effects.

## 5 References

- 7 Alberti, K.G.M.M., Gries, F.A., 1988. Management of non-  
insulin-dependent diabetes mellitus in Europe: a consensus  
9 view. *Diabet. Med.* 5, 275–281.
- 11 Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2001. Hypoglycemic effect  
of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J.*  
13 *Ethnopharmacol.* 78, 145–149.
- 15 Argueta, V.A., Cano, A.L., Rodarte, M.E., 1994. Atlas de las  
Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto  
17 Nacional Indigenista, México.
- 19 De Jesus, R.A., Cechinel-Filho, V., Oliveira, A.E., Schlemper,  
V., 2000. Analysis of the antinociceptive properties of  
21 marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine*  
7, 111–115.
- 23 Donnelly, R., Emslie-Smith, A.M., Gardner, J.D., Morris,  
A.D., 2000. ABC of arterial and venous disease. Vascular  
25 complications of diabetes. *BMJ* 320, 1062–1066.
- 27 El Bardai, S., Lyoussi, B., Wibó, M., Morel, N., 2001.  
Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium*  
29 *vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously  
hypertensive rat. *Clin. Exp. Hypertens* 23, 329–343.
- 31 El Bardai, S., Morel, N., Wibó, M., Fabre, N., Llabres, G.,  
Lyoussi, B., Quetin-Leclercq, J., 2003. The vasorelaxant  
33 activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium*  
*vulgare*. *Planta Med.* 69, 75–77.
- 35 Freie, P.M., 1999. Mechanism and clinical effects of pioglitazone  
as a new agent for the treatment of Type-2 diabetes.  
37 *Arzneimittelforschung* 49, 835–842.
- 39 Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Seddik, A., Jana, M., 1999.  
Hypoglycemic response to *Zygophyllum gaetulum* extracts in  
patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J.*  
*Ethnopharmacol.* 64, 211–217.
- Lopez-Alvarenga, J.C., Aguilar-Salinas, C.A., Velasco-Pérez,  
M.L., Arita-Melzer, O., Guillen, L.E., Wong, B., et al.,  
1999. Acarbose vs. bedtime NPH insulin in the treatment of  
secondary failures to sulphonylurea-metformin therapy in  
type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.* 1, 29–35.
- Mughal, M.A., Jan, M., Maheri, W.M., Memon, M.Y., Ali,  
M., 2000. The effect of metformin on glycaemic control,

- serum lipids and lipoproteins in diet alone and sulphonylurea-treated type 2 diabetic patients with sub-optimal metabolic control. *J. Pakistan Med. Assoc.* 50, 381–386.
- Novaes, A.P., Rossi, C., Poffo, C., Pretti Jr., E., Oliveira, A.E., Schlemper, V., et al., 2001. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie* 56, 427–430.
- Perez-Guerrero, C., Herrera, M.D., Ortiz, R., Alvarez de Sotomayor, M., Fernandez, M.A., 2001. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 76, 279–284.
- Román, R.R., Flores, S.J., Partida, H.G., Lara, L.A., Alarcón, A.F., 1991. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Med.* 22, 87–93.
- Román, R.R., Alarcón, A.F., Lara, L.A., Flores, S.J., 1992. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch. Med. Res.* 23, 59–64.
- Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands and atherosclerosis: ending the heartache. *J. Clin. Invest.* 106, 629–631.
- Salas, I., Brenes, J.R., Morales, O.M., 1987. Antihypertensive effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) leaf extract on rats. *Rev. Biol. Trop.* 35, 127–130.
- Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., Bailleul, F., 2002. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol.* 79, 389–392.
- Secretaría de Salud, 2000. Proyecto de Modificación a la Norma oficial mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes. *Rev. Med. IMSS* 38, 477–495.
- VanderJagt, T.J., Ghattas, R., VanderJagt, D.J., Crossey, M., Glew, R.H., 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sci.* 70, 1035–1040.
- Wolffenbuttel, B.H., Gomis, R., Squatrito, S., Jones, N.P., Patwardhan, R.N., 2000. Addition of low-dose rosiglitazone to sulphonylurea therapy improves glycaemic control in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med.* 17, 40–47.
- Yamasaki, Y., Kawamori, R., Wasada, T., Sato, O., Omori, Y., Eguchi, H., et al., 1997. Pioglitazone (AD-4833) ameliorates insulin resistance in patients with NIDDM. *Tohoku J. Exp. Med.* 183, 173–183.